



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIAL RESEARCH CENTRE

STUDIUM INTERAKCÍ BARVIV S BIOPOLYMEREM CHITOSANEM

STUDY OF INTERACTIONS OF PIGMENTS WITH BIOPOLYMER CHITOSAN

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. PAVEL KOLESA

VEDOUCÍ PRÁCE

prof. Ing. MARTINA KLUČÁKOVÁ,
Ph.D.

SUPERVISOR

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP1001/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Pavel Kolesa	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce:	prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Studium interakcí barviv s biopolymerem chitosanem

Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je stanovit difuzivitu vybraných barviv v hydrogelech na bázi chitosanu a posoudit vliv pH na jejich transportní vlastnosti

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Pavel Kolesa
Student(ka)

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Náplní předložené diplomové práce je studium interakcí několika modelových azobarviv s biopolymerem chitosanem. Tyto interakce byly realizovány prostřednictvím difúzních procesů v hydrogelové matrici na bázi termoreverzibilní agarózy. Na základě použité difúzní metody (neustálená difúze v kyvetách) bylo možné otestovat, jaký vliv má hodnota pH prostředí na samotný proces difúze. Vzájemná interakce použitých barviv a chitosanu je elektrostatického charakteru. Aminoskupina chitosanu interaguje s funkčními skupinami zvolených modelových azobarviv a díky tomu ovlivňuje rychlost difúze. Jako modelová barviva byla vybrána Chicago sky blue 6B (C.I. 24 410), Sirius red (C.I. 35 780) a Reactive blue 49 (C.I. 621 526). Použitá difúzní metoda byla založena na monitorování časové závislosti difúzních profilů, které byly získány pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Předložená práce navazuje na bakalářskou práci a poskytuje ucelený pohled na reaktivitu chitosanu. Lépe tak umožňuje porozumět jeho chování v různých systémech. Neustálená difúze v kyvetách je použitelná pro stanovení reaktivity celé řady biopolymerů a jeví se jako univerzální nástroj pro studium transportních procesů v prostředí hydrogelů. Kromě univerzálnosti této metody je její nespornou výhodou jednoduchost a především finanční i technická nenáročnost.

ABSTRACT

This master's thesis was focused on the study of interaction of some organic azo dyes (model diffusion probes) with cationic biopolymer chitosan. These interactions were realized via diffusion processes in hydrogel media based on thermoreversible agarose. The main aim was study of influence of pH of solution on the diffusion process. Interactions of used dyes are based on electrostatic character. The aminogroup of chitosan interacts with the functional group of chosen dyes (anionic sulfonic group) and thus affects the process of diffusion. The model diffusion compounds were chosen organic anionic dyes Chicago sky blue 6B (C.I. 24 410), Sirius red (C.I. 35 780) and Reactive blue 49 (C.I. 621 526). The important content of this diffusion method is a monitoring of the time progression of diffusion profile by UV-VIS spectrophotometry. The presented work follows the bachelor thesis and shows comprehensive view of the reactivity of chitosan and its behavior in different systems. Unsteady diffusion in cuvettes appears to be a universal method for the study of reactivity of biopolymers and for the study of transport processes in hydrogel media. The diffusion method is universal, easy and cheap.

KLÍČOVÁ SLOVA:

difúze, chitosan, hydrogel, agaróza, organické barvivo, reaktivita biopolymerů

KEY WORDS:

diffusion, chitosan, hydrogel, agarose, organic dye, reactivity of biopolymers

KOLESA, P. *Studium interakcí barviv s biopolymerem chitosanem*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 81 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího práce a děkana FCH VUT.

.....

Bc. Pavel Kolesa

Na tomto místě bych velice rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce prof. Ing. Martině Klučákové, Ph.D. za odborné rady a obětovaný čas při vypracování diplomové práce, zejména při řešení experimentální části práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své přítelkyni a rodině za zázemí a neustálou podporu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	CÍL PRÁCE.....	8
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1	Biopolymery	9
3.2	Chitosan	9
3.2.1	Struktura a vlastnosti chitosanu	10
3.2.2	Výroba chitosanu	11
3.2.3	Rozpustnost chitosanu	12
3.2.4	Interakce chitosanu s ionty	13
3.2.5	Fyzikální formy chitosanu	14
3.2.6	Aplikace chitosanu	21
3.3	Azobarviva.....	26
3.3.1	Fyzikálně-chemické metody dekolorizace roztoků azobarviv	26
3.3.2	Biologické metody dekolorizace roztoků azobarviv	27
3.3.3	Chicago sky blue 6B.....	27
3.3.4	Sirius red F3B (Saturnová červeň F3B)	28
3.3.5	Reactive blue 49 (Ostazinová modř H-3R)	29
3.4	Agaróza.....	29
3.4.1	Využití agarózy.....	30
3.5	Gelové systémy.....	31
3.5.1	Disperzní systém.....	31
3.5.2	Gel	33
3.5.3	Dělení gelů.....	33
3.5.4	Vlastnosti gelů	34
3.6	Difúze.....	34
3.6.1	Fickovy zákony.....	36
3.6.2	Jednoduché difúzní modely	37
3.6.3	Složitější difúzní model – difúze s chemickou reakcí	38
3.6.4	Difúzní koeficient a metody jeho stanovení	39
4	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	42
4.1	Interakce chitosanu s barvivy.....	42
4.2	Modifikace chitosanu	45

4.3	Jiné biopolymery plnící funkci sorbentů.....	46
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
5.1	Použité chemikálie	47
5.2	Použité přístroje	48
5.3	Příprava vzorků pro testování stability barviv a sorpční experimenty	48
5.3.1	Příprava roztoků pro testování stability barviv v závislosti na pH.....	48
5.3.2	Příprava roztoku biopolymeru	49
5.3.3	Příprava hydrogelových vzorků pro sorpční experimenty	50
5.3.4	Příprava sorpčních experimentů	50
5.4	Příprava vzorků pro difúzní experimenty	51
5.4.1	Příprava hydrogelových vzorků s přídavkem biopolymeru	51
5.4.2	Příprava difúzních experimentů.....	53
6	DISKUZE A VÝSLEDKY	53
6.1	Studium stability barviv v závislosti na pH	53
6.2	Studium interakce chitosanu s barvivou pomocí sorpčních experimentů.....	54
6.3	Neustálená difúze v kyvetách	56
7	ZÁVĚR	69
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	71
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	76
9.1	Použité zkratky.....	76
9.2	Použité symboly.....	77
10	SEZNAM PUBLIKACÍ.....	78
11	SEZNAM PŘÍLOH.....	78

1 ÚVOD

Každý živý organismus je tvořen řadou více či méně složitých makromolekul, které lze souhrnně označit pojmem biopolymery. Jsou to látky, které tvoří podstatu fungování každého organismu. Všechny tyto látky nachází své uplatnění napříč mnoha průmyslovými odvětvími, především pak ve farmaceutických aplikacích. Mezi tuto velice početnou skupinu látek patří i chitosan. Jedná se o lineární polysacharid, který se nejčastěji vyskytuje jako heteropolymer chitin + chitosan. V posledních dekádách let dochází k enormnímu nárůstu publikovaných článků a patentů, týkajících se chitosanu. Je tedy zřejmé, že zájem o chitosan a jeho použití stále narůstá. Mezi charakteristické vlastnosti chitosanu patří zejména biokompatibilita, biodegradabilita a v současnosti se využívá i jeho chelatačních a adsorpčních vlastností. V porovnání s chitinem vykazuje chitosan daleko větší reaktivitu. Tento fakt je způsoben přítomností aminoskupiny, která může být ve vodných roztocích protonizována a díky tomu je chitosan označován za kationaktivní biopolymer. Právě přítomnost aminoskupiny ve struktuře chitosanu tvoří základní předpoklad pro interakci chitosanu s barvivou v předložené diplomové práci.

Ke studiu reaktivity chitosanu pomocí difúzních dějů lze využít hydrogelových forem vzorku. Ty jsou vhodné jak pro studium transportních procesů, tak i bariérových vlastností studovaných látek. Studium difúzních procesů v gelové fázi sebou přináší řadu výhod. Díky vlastnostem hydrogelu lze připravit vzorek o konkrétním definovaném tvaru a velikosti, což snáze umožňuje matematický popis transportních jevů. Navíc díky síťovité struktuře gelu není tolik ovlivňována difuzivita nízkomolekulárních látek tepelnými konvencemi.

V teoretické části práce je kladen důraz především na použité materiály (chitosan, agaróza, barviva). Nemalou část pak tvoří obecný úvod do problematiky difúzních procesů a metod stanovení difúzního koeficientu, jakožto základního parametru popisující transportní procesy. Závěr teoretické části práce je zaměřen na současný stav řešené problematiky, především se zabývá články studující interakce chitosanu s barvivou.

Cílem experimentální části práce bylo optimalizovat jednoduchou laboratorní techniku – neustálenou difúzi v kyvetách a zároveň zjistit, jaký je vliv pH prostředí na rychlost difúze v hydrogelové matici. Zjišťovaným parametrem byl efektivní difúzní koeficient. Základ použité metody tvořilo spektrofotometrické monitorování koncentrace modelových sond v podobě organických barviv v závislosti na čase a různých vzdálenostech od rozhraní hydrogel-roztok. Tyto sondy v podobě organických barviv byly vybrány na základě jejich stability v různých hodnotách pH v závislosti na čase. Z širšího množství vybraných barviv byly pro finální difúzní experiment zvoleny 3 barviva, a to na základě provedených sorpčních experimentů.

2 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem, kterého má být dosaženo, je stanovení difuzivity vybraných modelových barviv v hydrogelech na bázi chitosanu a posouzení vlivu pH na jejich transportní vlastnosti. Dále pak optimalizování metody neustálené difúze v kyvetách pro studium reaktivity zvoleného biopolymeru. V následujících bodech jsou shrnuty hlavní cíle, kterých má být v předložené diplomové práci dosaženo:

- Výběr vhodných zástupců anionaktivních barviv, určení jejich stability v roztocích o různém pH v závislosti na čase a posouzení jejich použití pro difúzní experimenty.
- Zhodnocení reaktivity vybraných barviv na základě sorpčních experimentů.
- Optimalizace metody neustálené difúze v kyvetách pro vybraný biopolymer.
- Na základě rešerše porovnat současný stav řešené problematiky.
- Ověření a diskuze vlivu pH prostředí na transportní procesy realizované v hydrogelech s obsahem chitosanu.
- Shrnutí měření, diskuze výsledků a použitelnost metody pro studium reaktivity i dalších biopolymerních látek.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Biopolymery

Biopolymery jsou látky produkované živými organismy. Polymery obecně jsou makromolekulární látky přírodního či syntetického původu. Pojem makromolekula byl poprvé použit v roce 1920 německým vědcem a laureátem Nobelovy ceny Hermannem Staudingerem. Tento termín použil k pojmenování rozsáhlé, kovalentně vázané molekuly, obsahující více jak 1 000 atomů. Oproti tomu pojem polymer je výrazně starší a poprvé ho použil již v roce 1833 švédský chemik Jöns Jakob Berzelius. Termín polymer pochází z řeckého *polys*, neboli mnoho a *meros*, neboli část. Jedná se tedy o látky, v jejichž makromolekule se mnohonásobně opakuje monomerní jednotka (či jednotky), která tvoří základ celého polymeru. Pokud se v makromolekule objevuje pouze jeden typ monomerní jednotky (často označované pojmem *mer*), označujeme celou sloučeninu názvem homopolymer. Pokud je přítomno více monomerních jednotek, je taková makromolekula označována jako kopolymer [1].

Biopolymery (někdy označované jako polymerní biomolekuly) lze rozdělit na základě jejich monomerní jednotky na tři základní typy:

- polynukleotidy – patří sem kopolymery DNA a RNA
- polypeptidy – jedná se o krátké řetězce aminokyselin, které jsou součástí proteinů
- polysacharidy – polymerní uhlovodíkové řetězce vázané glykosidickou vazbou

Jeden z hlavních rozdílů mezi biopolymery a ostatními polymery je dán jejich strukturou. Jak již bylo zmíněno v úvodu, všechny polymery jsou tvořeny monomerními jednotkami. Biopolymery často mají poměrně složitou a dobře definovanou strukturu, avšak tato struktura nemusí být (např. v případě lignocelulózy) určujícím prvkem. Přesné chemické složení a pořadí, v jakém jsou tyto jednotky uspořádány, se např. u bílkovin nazývá primární struktura. Některé biopolymery mohou být zformovány do různých tvarů, které mohou určovat v závislosti na primární struktuře jejich biologickou funkci. Na rozdíl od biopolymerů mají syntetické polymery mnohem jednodušší a daleko více náhodné struktury. Tato skutečnost pak vede k rozdílné distribuci molekulových hmotností, která v případě biopolymerů chybí. Oproti tomu biopolymery jsou syntetizovány na základě určitých pravidel. Syntetické polymery jsou díky rozdílné hmotnostní distribuci charakterizovány indexem polydisperzity. V případě biopolymerů je index polydisperzity roven jedné [2].

3.2 Chitosan

Chitosan je přírodní polysacharid, který patří do rozsáhlé skupiny biopolymerů. Z chemického hlediska se jedná o *N*-acetyl glukosamin, který je částečně deacetylovaný. Právě stupeň deacetylce je jeden z hlavních parametrů, které popisují reaktivitu a chování chitosanu v nejrůznějších systémech. Stupeň deacetylce se nejčastěji pohybuje v rozmezí 60 – 100 % a určuje takové parametry chitosanu, jako je jeho rozpustnost, biodegradabilita, stupeň krystalinity atd. Chitosan je odvozen od chitinu a průmyslově se může vyrábět jeho alkalickou deacetylací. V porovnání s chitinem má však chitosan díky přítomnosti volné aminoskupiny výrazně vyšší reaktivitu a díky tomu i rozpustnost. Jak již bylo zmíněno jeho rozpustnost je dána stupněm deacetylce. Obecně platí, že chitosan je ve vodě prakticky nerozpustný, avšak

je rozpustný ve slabých kyselinách, jako je např. kyselina octová. Kromě organických kyselin je částečně rozpustný i v dimethylsulfoxidu (DMSO) a *p*-toluensulfonové kyselině [3].

Chitosan byl poprvé popsán roku 1859 francouzským fyziologem Charlesem Rougetem, který popsal deacetylaci chitinu působením koncentrovaného hydroxidu. Zabýval se studiem chitinu a jeho převedením do roztoku. Rouget zahříval chitin spolu s koncentrovaným hydroxidem draselným. Velice brzy pochopil, že se již nejedná o chitin, ale o nově vzniklou látku, která jak později zjistil, je rozpustná ve slabých roztocích některých kyselin. Tento objev znamenal výrazný průlom ve studiu chitinu, jelikož se tím otevřely významné možnosti pro jeho další využití. Trvalo dalších 35 let, než německý fyziolog a chemik Felix Hoppe-Seyler v roce 1894 pojmenoval částečně deacetylovanou formu chitinu názvem chitosan. S počátkem následujícího století chitosan začal poutat stále více pozornosti mnoha vědců, což vyvrcholilo v roce 1977. V tomto roce se v americkém Bostonu konala vůbec první mezinárodní konference (označována ICCO) věnovaná právě chitinu a chitosanu [4].

V přírodě se vyskytuje relativně v malém množství, a to pouze u některých typů hub rodu *Aspergillus* a *Mucor*. Oproti tomu chitin je po celulóze druhým nejrozšířenějším polysacharidem na zemském povrchu. Z tohoto důvodu se chitosan průmyslově vyrábí metodou *N*-deacetylace, při které se na chitin působí koncentrovanou zásadou (40 – 50 hm. % hydroxid sodný) při poměrně vysokých teplotách (až 100 °C).

Díky přítomnosti aminoskupiny, vznikající při deacetylaci chitinu, se chitosan chová v roztocích jako polykation a je také zařazen do skupiny tzv. kationaktivních biopolymerů. Právě na protonaci aminoskupin chitosanu ve vodných roztocích je založena experimentální část předložené diplomové práce. Z hlediska reaktivity chitosanu můžeme hovořit o třech reaktivních centrech. Ty jsou tvořeny primární aminoskupinou a primární či sekundární hydroxyskupinou. Naprostá většina aplikací chitosanu se zabývá především volnými aminoskupinami, ale řada aplikací může být založena i na substituci primární hydroxylové skupiny. Tyto skupiny mohou být substituovány tzv. *spacery*, které tvoří jakési spojovací články mezi molekulou chitosanu a aktivní látkou. Takovéto systémy pak lze využít v biomedicínských aplikacích pro cílený transport léčiv (viz kapitola 3.2.6) [5].

3.2.1 Struktura a vlastnosti chitosanu

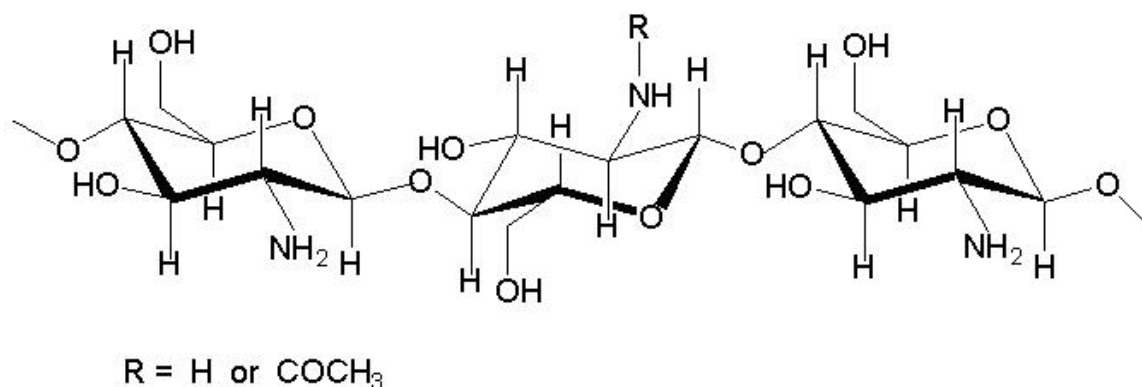
Chitosan je nejznámějším a také nejrozšířenějším derivátem chitinu. Jedná se o lineární polysacharid, tvořený jednotkami 2-amino-2-deoxy-D-glukopyranosy a 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosy, které jsou spojeny $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidickou vazbou (Obr. 1).

Jak plyne ze samotného procesu výroby chitosanu (kapitola 3.2.2), hlavní rozdíl mezi chitinem a chitosanem je dán stupněm deacetylace, kterým je průmyslově vyráběný chitosan nejčastěji charakterizován. Ten je definován jako poměr glukosaminových jednotek k celkovému počtu glukosaminových a *N*-acetylglukosaminových jednotek [6].

Na základě analýzy pomocí práškové rentgenové difrakce, kterou provedla skupina vědců kolem K. Okuyamy [7], byly objeveny celkově čtyři krystalické formy chitosanu. Tři hydratované formy (tedonová forma, forma II a L2), které ve vodných roztocích vytvářejí poměrně snadno soli s minerálními či organickými kyselinami. Čtvrtá forma tvoří anhydrát a vzniká přímým zahřátím hydratovaného chitosanu na teplotu dosahující 200 °C. Při této teplotě dochází ke zkracování vzdáleností mezi jednotlivými vrcholy a zároveň dochází

k oddalování řetězců. Tato dehydratace má ireversibilní charakter. Zmíněná čtvrtá forma chitosanu je v porovnání s ostatními formami nerozpustná, a to jak v minerálních, tak organických kyselinách. Navíc není schopna tvořit komplexy s kovy. Z hlediska použití hydratovaná forma chitosanu ztrácí funkci biomateriálu, avšak může být použita v mnoha aplikacích jako interní pryskyřice [8].

Díky svým unikátním vlastnostem je chitosan velmi ceněn a používán v širokém spektru průmyslových odvětví. Přítomnost volných aminoskupin z něj ve vodných roztocích činí polykationt. Díky těmto skupinám je schopen interakce s mnoha aniontovými sloučeninami. I přes svůj kladný náboj se při fyziologickém pH jedná o bioadhezivní polymer, což umocňuje jeho použití ve farmaceutických aplikacích [9].



Obr. 1 Struktura chitosanu [10].

3.2.2 Výroba chitosanu

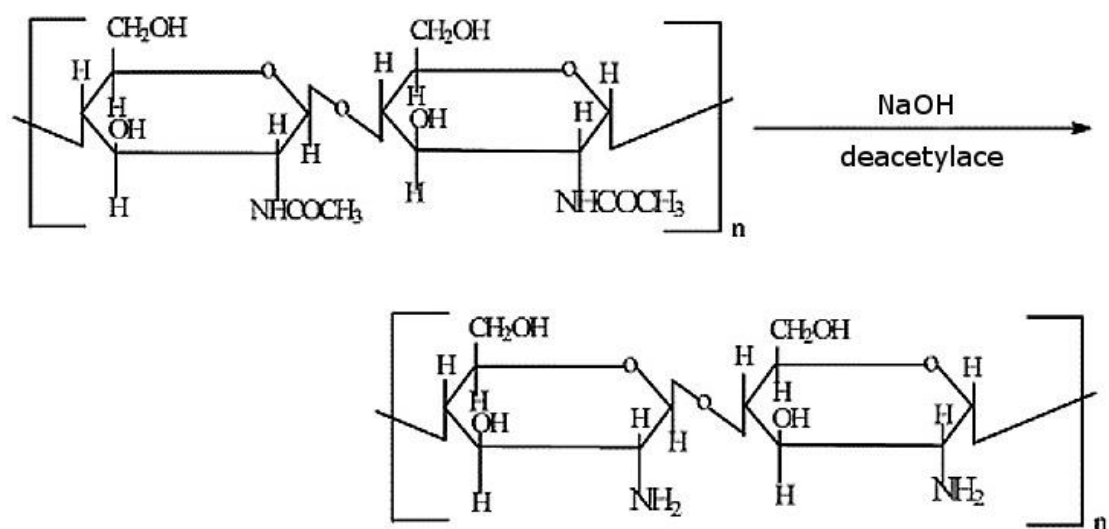
Jak již bylo zmíněno v jednom z předcházejících odstavců (kapitola 3.2), základním zdrojem pro průmyslovou výrobu chitosanu je chitin. Ten lze získat ze schránek mořských živočichů, zejména korýšů, a také z mycelia některých druhů hub. V prvním případě je výroba chitinu úzce spjata s potravinářským průmyslem. Odpadní produkty ze zpracování mořských živočichů jsou pak dále využívány právě k výrobě chitinu. V tom druhém případě je samotná výroba chitosanu, resp. chitosan-glukanových komplexů spjata s fermentačními procesy. Ty jsou velmi podobné například výrobě kyseliny citronové pomocí houby *Aspergillus Niger*. Působením zásad na chitosan-glukanové komplexy dochází jednak k deacetylaci chitinu a současně k odstranění přítomných proteinů.

Tím nejrozšířenějším procesem výroby chitosanu však zůstává zpracování chitinu vzniklého jako odpadu ze zpracování mořských živočichů. V prvním kroku je nezbytné odstranění proteinů a především uhličitanu vápenatého ze vstupních surovin. To se provádí pomocí vysoce koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Výsledkem je získání čistého chitinu, který je dále podroben deacetylaci pomocí 40 hm. % roztoku hydroxidu sodného při teplotě dosahující 120 °C. Pro získání chitosanu se stupněm deacetylace 70 % je chitin v této lázni ponechán po dobu dvou až tří hodin (Obr. 2).

Výroba chitosanu z odpadů vzniklých při zpracování mořských živočichů umožňuje výrazně snížit jejich množství a díky tomu snížit zátěž pro životní prostředí. Produkce chitinu a chitosanu je v řadě případů spjata s produkcí karotenoidů, a díky tomu lze zvýšit ekonomický zisk ze zpracování chitinu. Schránky některých korýšů totiž obsahují značné množství

astaxanthinu. Jedná se o karotenoid, který dosud nebyl syntetizován a je mimo jiné prodáván jako doplňková látka v akvaristice.

Často se hovoří o ekonomických aspektech výroby chitosanu, které pak ovlivňují jeho výslednou cenu. K průmyslové produkci 1 kg chitosanu (stupeň deacetylace cca 70 %) je zapotřebí 6,3 kg kyseliny chlorovodíkové, 1,8 kg hydroxidu sodného, 0,5 t procesní vody a přibližně 0,9 t vody určené k chlazení směsi. Další důležitou položkou určující cenu chitosanu je také cena dopravy. Ta se u jednotlivých destinací výrazně liší. Kromě USA či Číny je v dnešní době velké množství chitosanu komerčně dodáváno z Indie, Japonska, Polska, Norska a Austrálie. Pro představu celosvětově rozšířená cena chitosanu (v malém množství) se u významnějších a ověřených dodavatelů (např. Sigma and Aldrich) pohybuje okolo 7,5 dolarů za 10 g [11].



Obr. 2 Deacetylase chitinu na chitosan [11]

3.2.3 Rozpustnost chitosanu

Jednou z často diskutovaných vlastností chitosanu je jeho rozpustnost. Až na některé výjimky je ve vodě prakticky nerozpustný. Jednou z těchto výjimek může být chitosan se stupněm deacetylace 50 %. Jak zmiňují někteří autoři ve svých publikacích, takto připravený chitosan vykazuje částečnou rozpustnost ve vodě při pokojové teplotě a může tvořit transparentní gely s vysokým obsahem vody. Otázkou však zůstává, zdali lze chitosan s tak nízkým stupněm deacetylace ještě nazývat chitosanem, či jestli se už nehovoří o chitinu. Ať už je správně jakýkoliv název, lze takový biopolymer hojně využít v medicíně, např. v podobě hydrogelových scaffoldů (viz 3.2.6) [6].

Při reakcích s kyselinami může vytvářet jejich soli. Rozpustnost vzniklých solí je pak závislá na vlastnostech příslušného aniontu. Obecně lze však říci, že ve vodě je tato rozpustnost velmi omezená.

Naopak poměrně dobře se chitosan rozpouští ve slabých organických kyselinách, kterými jsou kyselina mravenčí, octová, citrónová či benzensulfonová. Nejoblíbenějším rozpouštědlem je však kyselina octová, která je majoritně využívána k přípravě roztoků s chitosanem. Kromě zmíněných slabých organických kyselin, lze pro přípravu jeho roztoku v praxi použít i některé minerální kyseliny. Těmi může být kyselina chlorovodíková, jodovodíková, bromovodíková,

chloristá či dusičná. S nárůstem koncentrace kyseliny chlorovodíkové a bromovodíkové může dojít k vysrážení chitosanu z roztoku [12].

V organických rozpouštědlech je jeho rozpustnost, až na několik výjimek, velmi nízká. Jednu z výjimek může tvořit DMSO (dimethylsulfoxid), nebo polární rozpouštědlo dimethylformamid (DMF). Prakticky nerozpustný je chitosan v etanolu, neutrálních a alkalických roztocích, které mají $\text{pH} > 6,5$. To přímo souvisí s hodnotou disociační konstanty pK_A , která se pohybuje okolo 6,5 [13].

3.2.4 Interakce chitosanu s ionty

Jak již bylo zmíněno, chitosan má dvě reakční centra, která jsou schopna interagovat s ionty kovů a s některými z těchto iontů tvořit komplexy. Tyto interakce jsou dány především vysokým obsahem hydroxylových skupin a aminoskupin. Díky vysokému podílu hydroxylových skupin je řetězec více hydrofilní a zároveň přítomnost hydroxylových skupin přispívá k chelatačnímu efektu. Vysoký podíl aminoskupin naopak poskytuje při nižší hodnotě pH kladný náboj. Hodnota disociační konstanty je u přítomné aminoskupiny $\text{pK}_A = 6,5$. Interakce chitosanu s ionty kovů pomocí zmíněných reakčních center může být zprostředkována pomocí řady procesů. Mezi ně patří zejména elektrostatické interakce, chelatace či iontová výměna. Přítomnost jednotlivých procesů je určena hodnotou pH prostředí a typem kovu [14].

Aminoskupiny chitosanu tvoří hlavní vazebná místa pro zachyt kovových iontů. Dusíkové atomy poskytují volné elektronové páry, které následně mohou tvořit s ionty kovů koordinační vazby. Jak již bylo zmíněno, tyto mechanismy jsou silně závislé na hodnotě pH roztoku. Při klesajícím pH významným způsobem roste protonace aminoskupin. Díky tomu dochází k nárůstu interakcí s aniontovými sloučeninami pomocí elektrostatických interakcí. Právě tento mechanismus tvoří základ předložené diplomové práce. Chitosan interagoval při nižší hodnotě pH s použitými modelovými anionaktivními barvivami a na základě této interakce docházelo k ovlivňování rychlosti difúze barviva v hydrogelu. Naopak protonace vede ke snížení chelatačních schopností. Kovové kationty tedy mohou být adsorbovány pomocí koordinačního mechanismu na aminoskupiny chitosanu, a to při hodnotě blízké neutrálnímu pH prostředí. Při klesající hodnotě pH vlivem protonace dochází k desorpci kovových kationtů. Změnou pH prostředí tak lze docílit cílené regenerace chitosanu jako použitého sorbentu.

Chitosan může být různě modifikován pomocí chemických či fyzikálních procesů, které vedou k syntéze nového materiálu s požadovanými vlastnostmi. Takovéto modifikace vedou jak ke změně reaktivity chitosanu (zvýšení afinity pro sorpci kovů, změna selektivity či pH optima pro sorpci kovů), tak ke změně sorpční kinetiky (změna difúzních vlastností atd.).

Existuje mnoho případů, kdy nelze jednoznačně říci, že sorpce probíhá pouze mechanismem chelatace, či jen mechanismem elektrostatické interakce na protonované skupiny polymeru. Může totiž docházet k tomu, že chelatace kovových kationtů v roztoku způsobí tvorbu kovového aniontu a následně se chelatační mechanismus přemění na elektrostatickou interakci.

3.2.4.1 Výměna iontů a elektrostatická interakce

Protonace funkčních aminoskupin v kyselých roztocích je dána hodnotou pK_A polymeru, která je závislá na stupni deacetylace. Bylo zjištěno, že hodnota pK_A chitosanu se v závislosti

na stupni deacetylace mění v rozmezí 6,3–7,2. Tyto vlastnosti jsou klíčovými parametry pro popis elektrostatických interakcí mezi chitosanem a anionty.

Sorpce kovových aniontů a anionaktivních barviv na chitosan a jeho deriváty se zabývá velké množství studií. Při neutrální hodnotě pH je přibližně 50 % z celkového počtu aminoskupin protonováno a tím pádem teoreticky k dispozici pro sorpci kovových aniontů. Nicméně přítomnost volných aminoskupin může způsobit přímou chelataci kovových kationtů, které mohou dle povahy kovu koexistovat s anionty. Při poklesu hodnoty pH roztoku dochází k nárůstu protonace aminoskupin a výrazně tak narůstá účinnost sorpce aniontů na chitosanu. Tato účinnost může být charakterizována poměrem sorpční kapacity a rovnovážné koncentrace roztoku barviva, tzv. distribučním koeficientem:

$$D_s = \frac{q}{c_{eq}} \quad (1)$$

kde D_s je distribuční koeficient, který je definován jako poměr sorpční kapacity q (množství adsorbovaného kovu na gram sorbentu) a rovnovážné koncentrace c_{eq} . Logaritmus distribučního koeficientu může být vyneseno v grafu oproti pH prostředí a ze sklonu křivky lze určit stechiometrii výměny iontů (množství kovu adsorbovaného na mol protonovaných aminoskupin). V případě surového chitosanu dosahuje distribuční koeficient svého maxima při hodnotě pH roztoku 2–4. Při pH nižším než v případě sorpčního maxima dochází ke snižování distribučního koeficientu. Tento efekt je způsoben silným konkurenčním účinkem aniontů, které se mohou vzájemně odpuzovat. Zmíněný „konkurenční“ efekt je předmětem mnoha studií, jejichž cílem je vývoj takových derivátů chitosanu, které jsou méně citlivé na přítomnost konkurenčních aniontů. Díky tomu lze navýšit sorpční kapacitu nově nasyntetizovaných derivátů při velmi nízkém pH [15].

3.2.5 Fyzikální formy chitosanu

Chitosan může být připraven ve velmi širokém rozsahu fyzikálních forem, a to za použití nejrozličnějších technologických procesů. Tyto fyzikální formy chitosanu mohou být velice různorodé pro jednotlivé aplikace a liší se v mnoha vlastnostech (hustota, rozpustnost, molární hmotnost, barva, stupeň deacetylace, mechanické vlastnosti...). Nejčastěji lze chitosan nalézt ve formě prášku, avšak široké zastoupení má i v mnoha dalších fyzikálních formách, zmíněných v této kapitole.

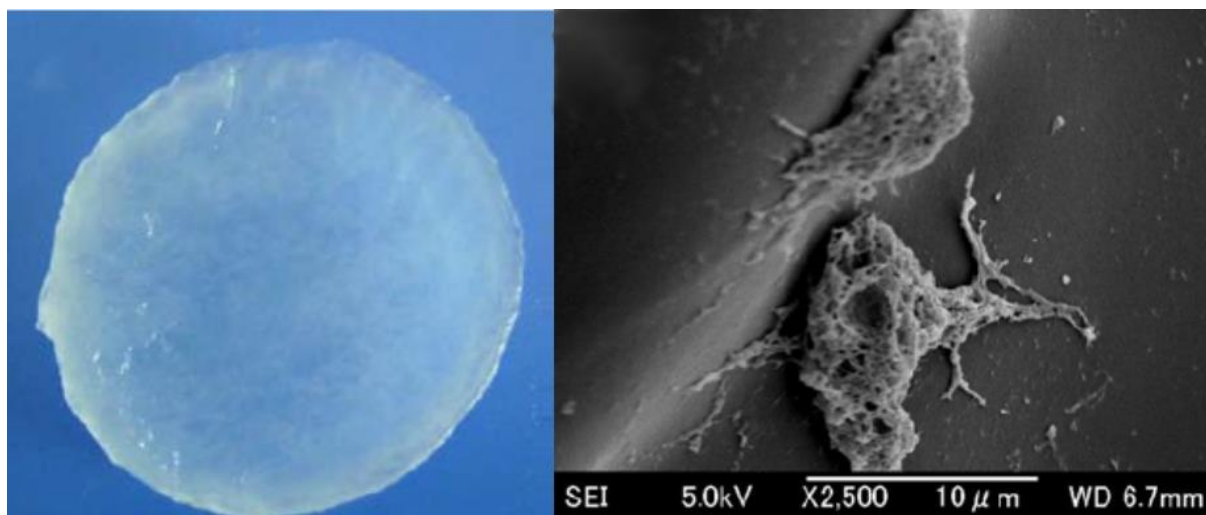
3.2.5.1 Hydrogely

Biopolymery ve formě hydrogelů jsou velice důležitou třídou polymerních materiálů, zejména z hlediska jejich aplikace v nejrozličnějších odvětvích průmyslu. Především biomedicínské a farmaceutické využití, či ochrana životního prostředí. V literatuře již bylo popsáno nepřeberné množství metod přípravy hydrogelů. Prvním krokem přípravy je v naprosté většině případů rozpuštění vhodného množství chitosanu v rozpouštědle (často směsi organických kyselin či organických rozpouštědel) a tvorba emulzí. Následným zesíťováním polymeru vzniká hydrogel. Tímto způsobem vznikají tzv. kovalentní gely. Z důvodu zvýšení stability takto připraveného hydrogelu lze použít jako vstupní surovinu chemicky modifikovaný chitosan. Jedním z nejčastěji používaných a nejoblíbenějších síťovacích činidel chitosanu je glutaraldehyd. Zesíťováním pomocí glutaraldehydu vznikají vysoce odolné a stabilní chemické

gely. Nevýhodou pro použití glutaraldehydu v biomedicínských aplikacích může být jeho toxicita. Jeho alternativou v těchto aplikacích tak může být například polyethylenglykol [16].

Další typ hydrogelů, tzv. fyzikálně síťovaných nekovalentních hydrogelů, vzniká interakcí chitosanu s polyelektrolyty. Při vysokém stupni protonace aminoskupin chitosanu dochází spontánně ke vzniku makromolekulárních komplexů reakcí s anionaktivními polymery. Tyto komplexy jsou v zásadě nerozpustné ve vodě a tvoří hydrogely. Různorodost a fyzikálně chemické vlastnosti vzniklých komplexů jsou určeny jednak vlastnostmi polyelektrolytu (molekulová hmotnost, funkční skupiny, pružnost, hydrofobicita a hydrofilita, kompatibilita), ale také reakčními podmínkami (teplota, koncentrace, pH...). Pro přípravu fyzikálně síťovaných hydrogelů lze jako anionaktivní polyelektrolyt použít alginát, kyselinu hyaluronovou či karboxymethylcelulózu [17].

Tyto gely nachází široké uplatnění v medicíně, zejména pak ve tkáňovém inženýrství. Díky biodegradabilitě chitosanu mohou zmíněné gely posloužit jako scaffoldy, tudíž podpora pro růst a výživu buněk. Příklad hydrogelu na bázi chitosanu znázorněn na obrázku níže (Obr. 3).



Obr. 3 Hydrogelový scaffold na bázi chitosanu a kolagenu, sloužící pro regeneraci tkání. Levá část obrázku znázorňuje připravený hydrogel, na pravé části je patrný růst buněk na scaffoldu [18].

Některé fyzikálně síťované hydrogely vykazují termosenzitivní vlastnosti. Takové gely lze využít jako injektabilní hydrogely, které mají teplotu tuhnutí blízkou fyziologickému pH. Díky tomu lze regenerovat poškozené tkáně bez větších chirurgických zásahů.

3.2.5.2 Filmy a membrány

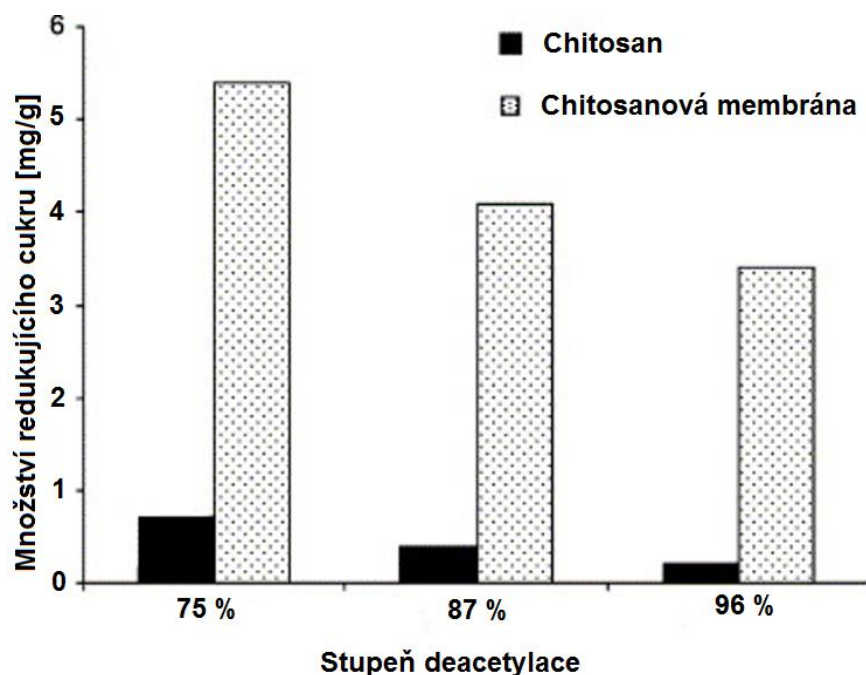
Je dlouhodobě známo, že chitosan vykazuje dobré filmotvorné vlastnosti, které mohou být použity pro mnoho aplikací, zahrnujících péči o pokožku, kosmetiku, kontaktní čočky, membrány a filtry pro separaci látek. Filmy tvořené chitosanem jsou transparentní, homogenní, flexibilní a mají dobré mechanické vlastnosti. Kromě toho jsou filmy tvořené chitosanem relativně husté a netvoří póry. Vlastnosti vzniklých filmů či membrán jsou silně závislé na jejich morfologii, kterou ovlivňuje řada faktorů, jako jsou molekulová hmotnost a stupeň deacetylace chitosanu. V neposlední řadě ovlivňuje morfologii také samotný výběr metody pro přípravu. Kromě těchto parametrů výrazně ovlivňuje morfologii vzniklých filmů i volba vhodného rozpouštědla. Tím nejčastějším rozpouštědlem je bezesporu roztok kyseliny octové o vhodné

koncentraci (nejčastěji 4 hm. %). Rozpuštěním chitosanu v některých dalších organických kyselinách (např. kyselině mléčné) lze získat fólie, které jsou měkčí a významně pružnější v porovnání s těmi, které jsou připraveny z kyseliny octové [17].

Díky rozmanitému využití filmů a membrán na bázi chitosanu se řada autorů zaměřuje na studium výše zmíněných vlastností a zkoumají jejich vliv na vznik výsledných membrán. Skupina autorů kolem prof. Trunga [19] se zabývala vlivem stupně deacetylce chitosanu na vlastnosti připravených membrán. Ke svému experimentu použili chitosan o stejné molekulové hmotnosti (okolo 810 kDa), avšak rozdílném stupni deacetylce: 75 %, 87 % a 96 %. Ve všech případech byl chitosan rozpuštěn v 0,17 M roztoku kyseliny octové. Konkrétně se jednalo o roztok chitosanu o koncentraci 0,5 hm. %. Po rozpuštění byl roztok chitosanu vlit na plastovou formu o definovaných rozměrech a sušen při teplotě 40 °C. Následně byl neutralizován namáčením v 0,1 M roztoku hydroxidu sodného po dobu 30 minut a poté byla membrána opakovaně promyta v destilované vodě a vysušena při teplotě 40 °C. Vzniklé membrány byly transparentní s průměrnou tloušťkou 10 µm.

Chitosan se stupněm deacetylce 75 % vykazoval 1,5krát vyšší absorpci vody a zároveň 2krát vyšší permeabilitu v porovnání s membránou z chitosanu o stupni deacetylce 96 %. Tento fakt je způsobený nižším stupněm krystalinity (přibližně o 20 %). Je to zřejmé, jelikož snížení stupně krystalinity má za následek nárůst specifického povrchu, který přispívá k nárůstu absorpce. Dále bylo zjištěno, že membrány vzniklé z chitosanu s vyšším stupněm deacetylce (pravděpodobně v důsledku vyššího stupně krystalinity) vykazují vyšší pevnost v tahu a současně vyšší elasticitu.

Kromě studia výše zmíněných vlastností se vědci v předloženém experimentu zaměřili také na studium biodegradability chitosanu ve formě prášku i ve formě membrány, a to pro všechny tři studované stupně deacetylce. K tomu využili enzym lysozym, který je schopen hydrolyzovat $\beta(1\rightarrow4)$ vazby mezi jednotlivými monomerními jednotkami chitosanu. Pomocí Dygertovy metody (založené na UV-VIS spektrofotometrickém stanovení) určili množství redukujícího cukru, vznikajícího při degradaci chitosanu působením lysozymu. Bylo zjištěno, že chitosanové membrány připravené z chitosanu s menším stupněm deacetylce jsou méně odolné vůči působení lysozymu a rychleji tak degradují. To může být způsobeno nižším množstvím *N*-acetylglukosaminových jednotek. Lysozym totiž degraduje přednostně vazby mezi *N*-acetylglukosaminovými, v porovnání s *D*-glukosaminovými. Díky tomuto faktu je chitin výrazně náchylnější k enzymové degradaci v porovnání s chitosanem. Výsledky studia biodegradability znázorněny níže (Obr. 4).

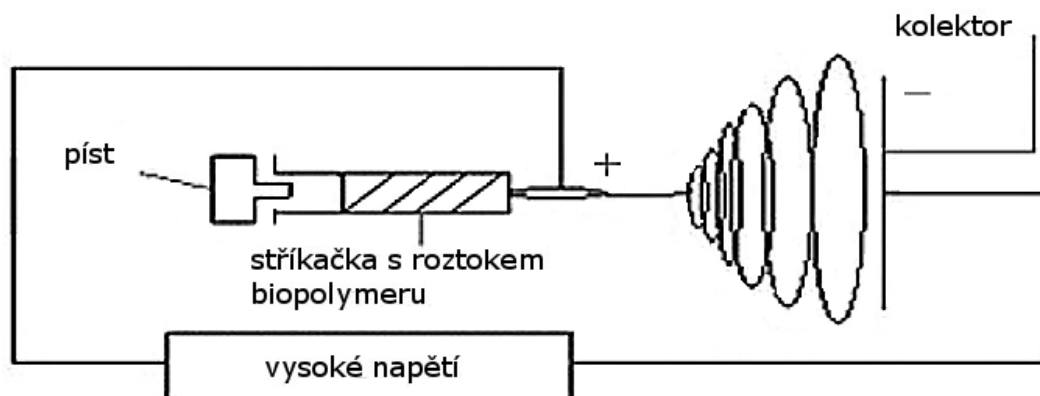


Obr. 4 Biodegradabilita chitosanu a chitosanové membrány studována působením lysozymu [19]

3.2.5.3 Vlákna

Zvýšený zájem o rozvoj technik umožňujících přípravu chitosanových vláken přichází v době, kdy se začala objevovat myšlenka využít jedinečných vlastností chitosanu ve formě textilií. Vlákenná forma přináší řadu výhod v porovnání s jinými formami chitosanu, především pak s jeho práškovou podobou. Konkrétně se jedná o vynikající mechanické vlastnosti, které mohou být podpořeny kombinací chitosanu s některými jinými biopolymery. Touto kombinací lze částečně snížit výrobní náklady a zároveň zlepšit některé vlastnosti, jako např. elektrická vodivost, odolnost vůči vodě či bakteriálnímu působení. V dnešní době jsou popsány a dobře prostudovány vlákna vzniklá kombinací s kolagenem, polyvinylalkoholem, alginátem či vlákny přírodního hedvábí. Z hlediska použití v biomedicínských aplikacích mají obrovský potenciál vlákna vzniklá kombinací s kyselinou polyglutamovou. Tato vlákna vykazují vysokou pevnost, biokompatibilitu a v neposlední řadě jsou biodegradabilní [16].

V současné době jsou jediným limitujícím faktorem výrobní náklady spojené s produkcí vláken. K přípravě tzv. netkaných textilií se nejčastěji využívá metoda elektrostatického zvlákňování, která umožní produkci nanovláken. Přípravou nanovláken na bázi chitosanu se zabýval tým vědců kolem prof. Homayoniho z univerzity v íránském Isfahanu. Metoda elektrostatického zvlákňování byla založena na vnášení malého množství roztoku polymeru do systému s velmi vysokým napětím (17 kV). Roztok polymeru byl do systému přiváděn pomocí kovové kapiláry o průměru 0,7 mm, která tvořila anodu. Katoda byla tvořena kovovým kolektorem, umístěným ve vzdálenosti 16 cm od anody. Schéma elektrostatického zvlákňování je znázorněno na obrázku níže (Obr. 5). Tloušťka produkovaných vláken je dána, kromě vlastností roztoku polymeru, také napětím mezi elektrodami a rychlostí vytlačování roztoku polymeru z kapiláry. Tloušťka nanovláken (při rychlosti vytlačování polymeru $1,6 \text{ mm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) se pohybovala v závislosti na koncentraci chitosanu i kyseliny octové v rozmezí od 50 do 250 nm [20].



Obr. 5 Schéma metody elektrostatického zvlákňování biopolymeru [20]

3.2.5.4 Nanočástice

Jeden z nejrychleji se rozvíjejících výzkumů v oblasti chitosanu a přípravy jeho fyzikálních forem se točí právě okolo přípravy nanočástic. Pod pojmem nanočástic se označují koloidní částice s velikostí od 1 do 1 000 nm. Nanočástice chitosanu získávají v posledních letech velkou pozornost jako nosiče pro cílenou distribuci léčiv, jelikož poskytují výrazně lepší stabilitu, nízkou toxicitu, poměrně jednoduchou přípravu a umožňují různorodý způsob podávání léčiv. Hlavním předpokladem pro využití chitosanu v distribuci léčivých látek je jeho biodegradabilita, biokompatibilita a v neposlední řadě hraje velkou roli i přítomnost hydroxylové skupiny a aminoskupiny. Díky tomu může být mechanismus záchytu aktivní látky zprostředkován pomocí elektrostatických interakcí. Velikost nanočástic řádově v desítkách až stovkách nanometrů je vhodná nejen pro parenterální aplikaci, ale také pro aplikaci na sliznici, např. dutiny ústní, nosní či oční. Díky tomu lze aplikovat léčivou látku neinvazivní cestou. Zároveň účinnost mnohých léků v dosažení terapeutického účinku je v závislosti na čase velmi nízká. Často se také stává, že většina léku je distribuována do celého těla a díky tomu se pak velmi malé množství léčivé látky dostane do místa účinku. Tato myšlenka tvoří základ pro cílenou distribuci léčiva (viz kapitola 3.2.6).

Mezi faktory ovlivňující velikost nanočástic bezesporu patří molekulová hmotnost a stupeň deacetylce. Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, stupeň deacetylce je jednou z hlavních charakteristik chitosanu a hraje klíčovou roli při řadě procesů (rozpuštění, biodegradabilita...).

Příprava nanočástic je nejčastěji založena na přítomnosti kladně nabitých aminoskupin, které elektrostaticky interagují se záporně nabitými skupinami polyaniontu. Tím může být například tripolyfosfát sodný. Do roztoku chitosanu v kyselině octové je po částech přidáván polyaniont a dochází ke spontánnímu vzniku nanočástic. Kromě výše zmíněných parametrů a koncentrací jednotlivých složek může být velikost takto vzniklých nanočástic ovlivněna i rychlostí míchání roztoku či rychlostí přikapávání polyaniontu [21].

3.2.5.5 Mikrokuličky

Jako nosič léčiva umožňuje chitosan překonávat řadu obtíží, spojených s nežádoucími vlastnostmi léků. Jedná se především o nerozpustnost a hydrofobicitu mnoha léků. Díky tomu mnoho komerčních výrobců léčiv uvažuje nad využíváním chitosanu jako pomocné látky ve svých produktech. Běžný práškový chitosan však není vhodný pro přímou kompresi. Naopak

chitosanové mikrokuličky vzniklé pomocí sprejového sušení se jeví jako vhodná alternativa běžného práškového chitosanu pro tyto aplikace. Tato metoda přípravy mikrokuliček zahrnuje čtyři fáze:

- atomizace prostřednictvím rozprašovací trysky
- kontakt rozprašené látky s teplým vzduchem
- sušení rozprašených kapek
- sběr pevného chitosanu ve formě mikrokuliček.

Velkou výhodou sprejového sušení je variabilita vstupního materiálu. Díky tomu může být do rozprašovací trysky přiváděn roztok chitosanu s řadou dalších látek, zejména pak léčiv. Použité roztoky nejčastěji mají slabě kyselé pH. Pro samotnou aplikaci chitosanových kuliček ve farmaceutickém průmyslu je třeba vhodně volit velikost jednotlivých částic. Tu lze poměrně snadno ovlivňovat změnou parametrů sprejového sušení, např. průměrem trysky, rychlostí přiváděného roztoku, teplotou vzduchu.

Techniky sprejového sušení lze využít pro chitosanové soli, polyelektrolytové komplexy chitosanu s polyanionty, roztoky chitosanu s dalšími biopolymery (kolagen, ethylcelulóza...) či rozpouštědly (Obr. 6). Právě zmíněné chitosanové soli nachází vhodné uplatnění pro transport léčiv. Velikost těchto mikrokuliček se pohybuje od 2 μm do 5 μm a vykazují dobré tokové vlastnosti, které jsou důležité pro technologické zpracování [17].

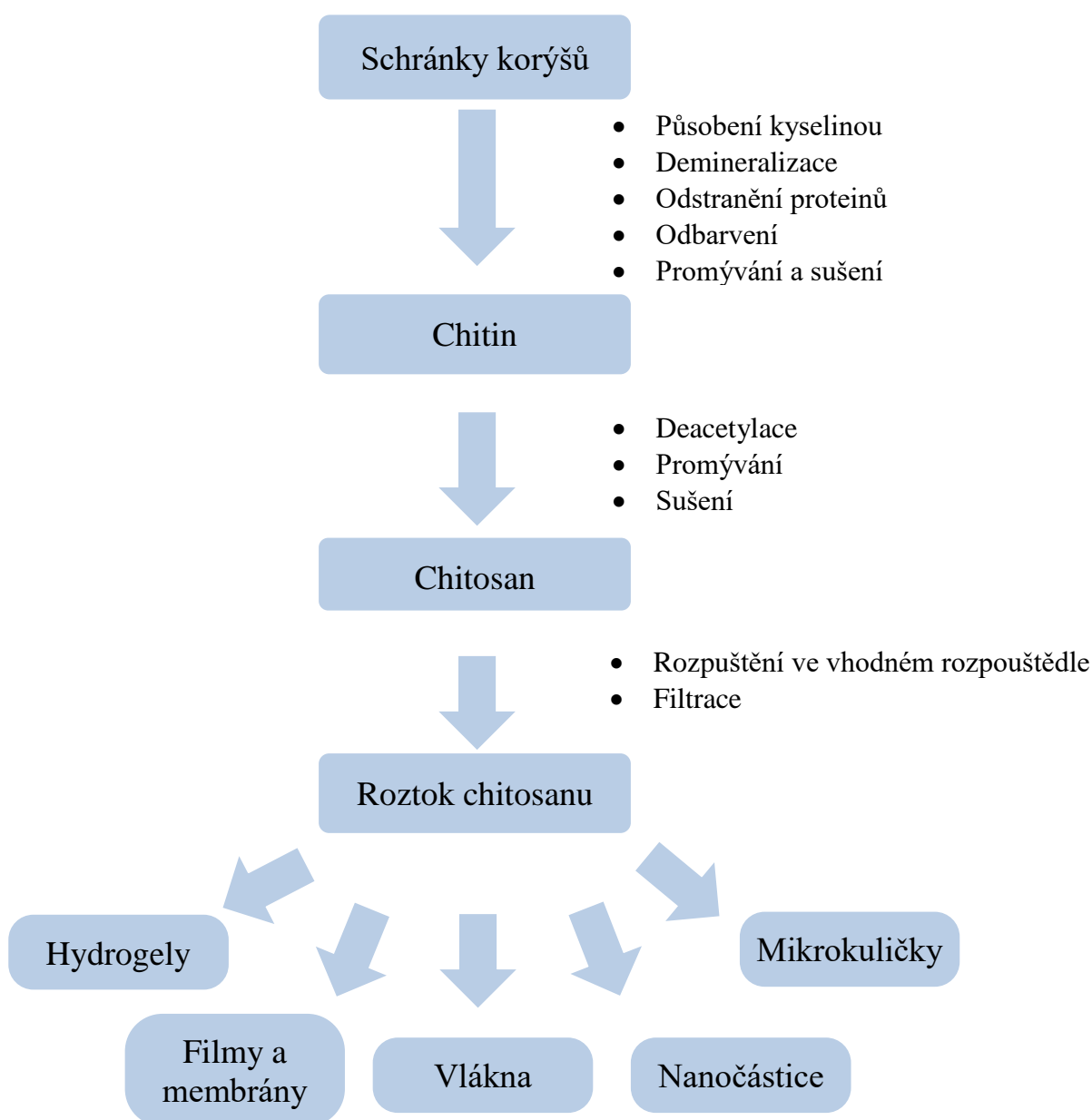


Obr. 6 *Methylpyrrolidon-chitosanové mikročástice připravené technikou sprejového sušení* [17].

Výrobou a studiem konkrétní aplikace chitosanových mikrokuliček s léčivou látkou se zabýval kolektiv kolem prof. Giunchediho z Farmaceutické fakulty univerzity v Sassari. Jako léčivou látku zvolili chlorhexidin, což je antiseptikum s baktericidním účinkem. Bylo zjištěno, že chlorhexidin je schopen se z chitosanových mikrokuliček uvolňovat výrazně rychleji, než z komerčně vyráběných práškových forem. Díky tomu docházelo k výraznému nárůstu

antibakteriální aktivity. Mikrokuličky byly slisovány do tablet jednak samostatně a jednak s přídatkem pomocných látek manitolu a alginátu sodného. Samotná aplikace tedy byla založena na podání bukálních tablet. Kromě zvýšené účinnosti léčivé látky byl zjištěn i výrazný nárůst doby uvolňování léčiva, což výrazně přispívá ke zvýšení terapeutického účinku [22].

Je zřejmé, že existuje opravdu velké množství fyzikálních forem chitosanu. V předchozí kapitole byl uveden výčet pouze základních a nejčastěji užívaných forem. Pro různé aplikace se hodí různé formy, které disponují určitými vlastnostmi. Obrázek níže (Obr. 7) znázorňuje schéma přípravy některé z výše zmíněných základních forem chitosanu. Výchozím materiálem jsou v tomto případě schránky korýšů, které však tvoří (i díky ekonomickému aspektu) základní surovinu pro výrobu chitosanu, resp. některou z jeho forem.



Obr. 7 Schéma přípravy některých z forem chitosanu [16]

3.2.6 Aplikace chitosanu

Jeho fyzikální a především chemické vlastnosti ho předurčují pro různorodá využití. Mezi jeho specifické vlastnosti, díky kterým má tak všestranné použití, patří biokompatibilita, biodegradabilita, bioaktivita, dále pak chelatační, antimikrobiální, adhezní a filmotvorné schopnosti. Nejrozsáhlejší studie chitosanu se týkají jeho biomedicínských a farmaceutických aplikací. Pozadu však nezůstávají ani další oblasti průmyslu, ve kterých se lze s chitosanem setkat. Široké uplatnění nachází také v kosmetice, zemědělství, potravinářství, textilním průmyslu, papírenském průmyslu či vodohospodářském průmyslu. V následující kapitole budou podrobněji popsány jednotlivé oblasti využití.

3.2.6.1 Kosmetika

Velmi často jsou v kosmetice používány organické kyseliny ve formě rozpouštědel. Rozpustnost chitosanu v roztocích některých organických kyselin ho předurčuje právě k těmto aplikacím. Kromě jeho fungicidních vlastností je kompatibilní s velkým množstvím biologicky aktivních komponent, které se v kosmetice využívají. Nedochází tak k negativnímu ovlivňování jejich vlastností. Díky jeho reaktivitě, především přítomnosti aminoskupiny lze kovalentně spojit molekulu chitosanu např. s látkami schopnými absorbovat škodlivé ultrafialové záření. Toho lze využít především v opalovacích krémech či dalších prostředcích ochrany před slunečním zářením. Prostředky na bázi chitosanu lze pro kosmetické aplikace rozdělit na tři skupiny: péče o vlasy, péče o pokožku a péče o dutinu ústní.

Chitosan a vlasy nesou vzájemně opačné náboje. Jakožto kationaktivní biopolymer je kladně nabitý, zatímco vlasy mají záporný náboj. Roztoky chitosanu tvoří na vlasech čirý, elastický film, který zvyšuje jejich měkkost, hebkost a mechanickou pevnost. Po přidání do směsi alkoholu a vody je schopen tvořit i gely. Díky těmto vlastnostem může být v šampónech, barvách na vlasy, tužících gelech, vlasových vodách a zejména pak v kondicionérech. Právě kondicionéry jsou založené na odstranění negativního náboje, což chitosan splňuje.

Dva hlavní parametry, které předurčují chitosan jako vhodný materiál pro styk s pokožkou jsou kladný náboj a molekulová hmotnost. Molekulová hmotnost chitosanu neumožňuje jeho hloubkovou penetraci do pokožky a může tak být tato látka používána v kosmetice. V některých přípravcích se lze setkat s kyselinou hyaluronovou, resp. její soli, která má významné hydratační schopnosti. Nevýhodou je však její vysoká cena. Proto může být nahrazována chitosanem, který také vykazuje poměrně dobré hydratační schopnosti a zároveň je výrazně levnější. Lze ho tedy nalézt v některých krémech, lacích na nehty, balzámech na rty, čistících emulzích...

Chitosan může být součástí zubních past, ústních vod i některých žvýkaček. Jedná se o přípravky, které si kladou za cíl zabránit tvorbě zubního plaku a kazu, případně osvěžit dech. Chitosanové soli obsažené v zubní pastě jsou schopny „zamaskovat“ nepříjemnou chuť oxidu křemičitého a zároveň mohou mít abrazivní čistící účinky [23].

3.2.6.2 Zemědělství

Semena některých rostlin vykazují po ošetření roztokem chitosanu zvýšenou rychlost růstu a zároveň zvýšenou odolnost vůči patogenům. Díky svým antimikrobiálním vlastnostem chrání rostlinu před působením hub a plísní. Díky svým chelatačním schopnostem je schopen zadržovat minerály a kovy, které umožňují výživu rostliny. Roztoky chitosanu mohou být také

využity jako doplňková půdní hnojiva. Jsou schopny zpomalovat průběh některých infekcí, které způsobují uvadání rostlin. Další výhodou je fakt, že se tento biopolymer skládá z polysacharidů, které mohou stimulovat aktivitu některých prospěšných mikroorganismů obsažených v půdě (např. *Bacillus*, *Pseudomonas*...) [24].

3.2.6.3 Potravinářství

Využití chitosanu v potravinářském průmyslu je poměrně známo, jelikož chitosan je netoxický pro teplokrevné živočichy. Jako vláknina zlepšuje při pravidelném užívání funkci tlustého střeva. Na trhu existuje velké množství preparátů ve formě tablet, které jsou založeny na přítomnosti chitosanu. Tyto doplňky stravy jsou určeny k redukci hmotnosti. Díky antimikrobiální aktivitě lze pomocí roztoků chitosanu ošetřit některé produkty, které jsou náchylné na bakteriální působení a lze tak výrazně prodloužit trvanlivost takovýchto výrobků.

Chitosan se může uplatňovat i jako součást stravy hospodářských zvířat, zejména pak drůbeže. Bylo zjištěno, že malý přírůstek chitosanu ve stravě snižuje spotřebu potravin a zároveň má pozitivní vliv na nárůst hmotnosti. Některé studie také prokázaly, že přidavek chitinu či chitosanu do stravy kuřat a telat má pozitivní vliv na růst specifických střevních bakterií, které produkují významný enzym pro trávení laktózy. Tyto studie mohou mít nesmírný význam pro člověka a některá zvířata, jenž trpí nesnášenlivostí na přítomnost laktózy [23].

3.2.6.4 Papírenský a textilní průmysl

Díky své biodegradabilitě může být využíván k produkci obalových materiálů, které jsou šetrné k životnímu prostředí. Přidavek chitosanu k recyklovanému papíru zvyšuje jeho pevnost, má hladší povrch a je výrazně odolnější vůči vlhkosti. V neposlední řadě jsou molekuly chitosanu podobné celulóze, která tvoří hlavní složku buněčných stěn rostlin. To usnadňuje jeho zpracování a současně klesá spotřeba dalších chemických přísad, které jsou jinak běžně používané při výrobě papíru. Velké uplatnění chitosanu lze kromě biodegradabilních obalů nalézt také při výrobě toaletního papíru či lepenky.

Deriváty chitinu a chitosanu mohou být také využity v textilním průmyslu. Díky svému náboji může být chitosan použit k výrobě vrstev s antistatickými účinky, nebo vrstev ochraňujících oděv před jeho znečištěním. Současně je chitosan využíván v textilním průmyslu k odstraňování textilních barviv z odpadních vod [25].

3.2.6.5 Chemický průmysl

Díky svým vlastnostem nachází chitosan široké uplatnění i při technikách chromatografické separace. Je to dáno především přítomností aminoskupin a primárních a sekundárních hydroxylových skupin. V literatuře je poměrně dobře popsáno využití chitosanu v tenkovrstvé chromatografii k separaci nukleových kyselin. Své majoritní využití v oblasti chromatografie má však v případě techniky vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Chitosan může být používán jako stacionární fáze kolon k extrakci fenolů, chlorofenolů a řady dalších látek [26].

3.2.6.6 Vodohospodářský průmysl

Vzhledem ke své polykationické povaze ho lze použít jako tzv. flokulační činidlo, popř. jako chelatační činidlo pro zachyt těžkých kovů. Chitosan je již dlouhodobě diskutován a používán

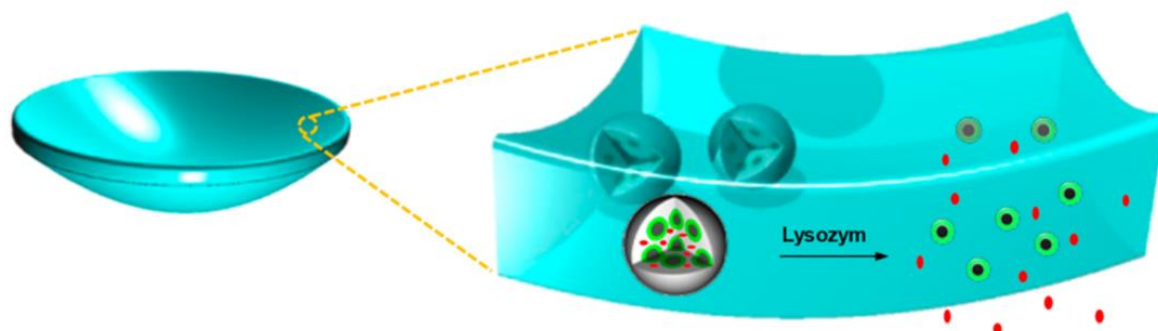
k odstraňování velkého množství látek z odpadních vod. Díky tomu se značné množství světové produkce chitosanu využívá právě k této aplikaci. V textilním průmyslu je používána celá řada barviv, které mají toxický charakter a jejich odstranění z roztoků je finančně poměrně nákladné. Chitosan může být použit jako adsorbent těchto barviv, jelikož vykazuje významnou sorpční kapacitu, která umožní odstranění barviv. Sorpční vlastnosti chitosanu jsou silně závislé na hodnotě pH. Při nižších hodnotách pH dochází k významnému nárůstu sorpční kapacity chitosanu pro sorpci anionaktivních barviv. Mechanismus těchto interakcí je podrobně popsán v jedné z předchozích kapitol (kap. 3.2.4). Může být využit také při přípravě membrán k procesům, jako např. osmóza, mikrofiltrace či dialýza [23].

3.2.6.7 Biomedicínské a farmaceutické aplikace

Dosud největší potenciál využití chitosanu se zdá být právě v těchto oblastech. V tomto odvětví se využívá jeho biokompatibilita, biodegradabilita, dobré adheze či filmotvorných vlastností. Díky svým biodegradabilním vlastnostem je schopen fungovat jako nosič léčiva umožňující postupné uvolňování léčivé látky. S rostoucím časem dochází k rozkladu chitosanového obalu a do těla se tak mohou řízeně uvolňovat léčivé látky. Technologie léčiv s řízeným uvolňováním se začaly objevovat teprve v 80. letech minulého století. Tento poměrně mladý obor je založen na dosažení reprodukovatelného uvolňování léčiva do konkrétního místa po výrazně delší dobu. Díky tomu lze minimalizovat vedlejší účinky a zefektivnit samotnou léčbu. Pro konkrétního pacienta to také přináší výhody v podobě snížení frekvence často nepříjemné aplikace léčivé látky. Většina léků je při běžném konvenčním podání uvolněna ihned po podání, koncentrace látky v požadovaném místě dosahuje maxima a po krátké době opět klesá pod hodnotu koncentrace odpovídající terapeutickému efektu. Právě chitosan patří mezi biodegradabilní polymery, které lze pro tyto aplikace využít. Díky funkčním skupinám chitosanu může být léčivo kovalentně připojené k biodegradabilní molekule, případně dispergováno v polymerní matici. Díky degradaci chitosanu pak dochází k postupnému uvolňování léčiva a tím je dosaženo optimální terapeutické hladiny koncentrace léčiva. Kromě toho je chitosan netoxický, snadno vstřebatelný a je schopen tvořit gel při nižších hodnotách pH. Díky tomu může „ochránit“ léčivo před jeho degradací působením žaludečních šťáv. Všechny tyto vlastnosti z něj dělají ideální polymer pro využití v systémech léků s postupným uvolňováním [27].

Jednou z aplikací chitosanu v systémech s řízeným uvolňováním se zabýval tým vědců kolem Ho-Joong Kima. Cílem jejich práce byla příprava kontaktních čoček k léčbě glaukomu (zelenému zákalu). Častou překážkou při léčbě některých zrakových onemocnění je nízká efektivní dávka léčiva. Za nejjednodušší způsob aplikace léčiva jsou považovány oční kapky. Avšak vlivem přirozené ochrany oka dochází k odplavování velkého množství léčivé látky. Uvádí se, že na oční sliznici zůstává pouze 5 – 10 % z původní dávky. Vzhledem k nízké efektivitě běžné konvenční léčby navrhli výše zmínění autoři postup přípravy hydrogelu, který umožňoval zefektivnit distribuci léčivé látky na sliznici oka. Ve svém experimentu použili uhlíkové nanočástice, tzv. nanodiamanty, na které navázali léčivou látku timolol maleát. Tyto nanodiamanty byly následně zesíťovány pomocí chitosanu do malých částic obsažených v hydrogelu. Řízené uvolňování léčiva bylo založeno na přítomnosti enzymu lysozymu, který je obsažen ve slzách. Působením lysozymu totiž docházelo k postupné degradaci chitosanového obalu a následnému uvolňování aktivní látky. Schéma připravené kontaktní čočky znázorněno

na obrázku níže (Obr. 8). Díky tomu je zajištěna řízená distribuce léčiva po dobu až 24 hodin [28].

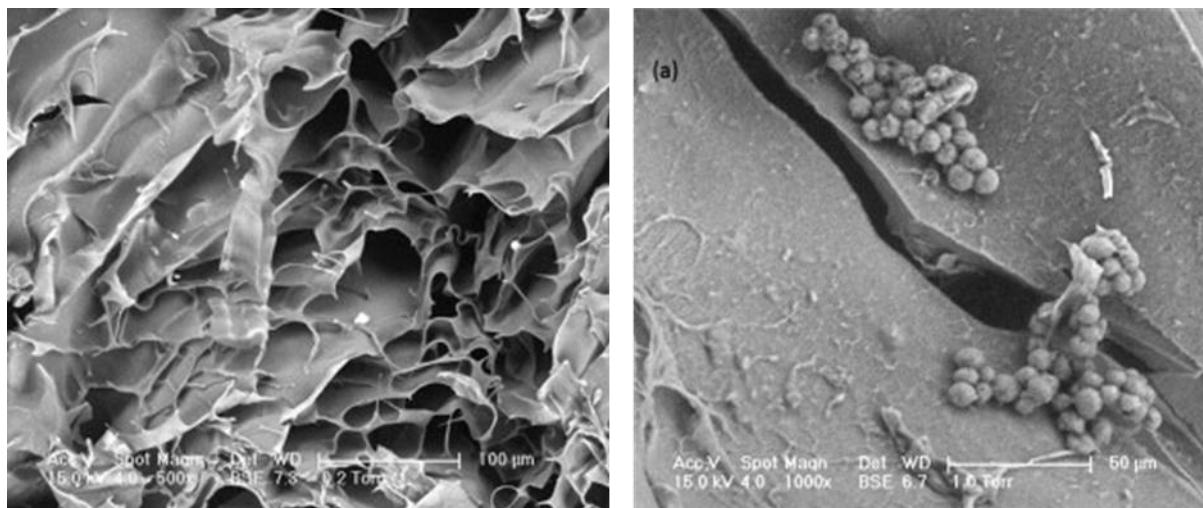


Obr. 8 Kontaktní čočka pro léčbu glaukomu. Černo-zeleně znázorněny nanodiamanty, červeně timol maleát, šedý obal částice tvořen chitosanem [28].

V oblasti biomedicínských aplikací má chitosan významné postavení i v systémech s řízenou distribucí léčiva. V tomto odvětví hraje velice důležitou roli samotná struktura chitosanu. Kromě aminoskupiny zde lze využít i přítomnosti primární hydroxylové skupiny. Ta může být chemicky substituována spojovacími články, tzv. *spacery*, které umožňují navázat aktivní složku. Tou může být samotné léčivo, případně skupina, která je zodpovědná za distribuci léčiva či změnu rozpustnosti látky v konkrétním prostředí. Tímto způsobem je možné chitosan využít jako nosič protinádorové látky na místo jejího účinku. Příkladem může být alkaloid kamptotecin. Je velmi účinný při léčbě nádoru tlustého střeva, močového měchýře i žaludku, avšak mezi jeho nevýhody patří nízká rozpustnost a naopak vysoká toxicita. Tento problém lze vyřešit právě jeho kombinací s chitosanem. Zvýší se jeho rozpustnost a zároveň cíleným transportem a řízeným uvolňováním sníží jeho toxicita. Průnik makromolekulárního léčiva do buňky může probíhat difuzí uvolněného léčiva, nebo endocytózou sloučeniny polymer-léčivo [5].

Tkáňové inženýrství je jednou z oblastí biomedicíny, kde chitosan zaujímá velice důležité postavení. Existuje obrovské množství studií, které se zabývají využitím chitosanu při přípravě tzv. *scaffoldů*, někdy označovaných českým ekvivalentem nosné lešení. Jedná se o jakousi podpůrnou kostru, která umožňuje výživu a růst nových buněk, jenž v ideálním případě nahradí poškozenou tkáň. Existuje velké množství typů scaffoldů, které mohou být vyrobeny z chitosanu. Vzhledem k zaměření předložené diplomové práce jsou zajímavé především hydrogelové scaffoldy. Jedna z možností přípravy takového scaffoldu je pomocí gelace s využitím záporně nabitého biopolymeru. Přípravou takového hydrogelu se zabývala skupina vědců kolem Baysala z Biotechnologického institutu v Istanbulu [29]. Pro přípravu scaffoldu o požadovaných mechanických i biologických vlastnostech využili chitosan v kombinaci s alginátem sodným (Obr. 9). Ten je obdobně jako chitosan přírodním polysacharidem, je biokompatibilní, biodegradabilní a především díky přítomnosti karboxylové skupiny je při fyziologickém pH záporně nabitý. Díky tomu je schopen interagovat s chitosanem a tvořit tak bohatou makromolekulární síť hydrogelu. Pro zlepšení mechanických vlastností hydrogelu bylo ještě přidáno síťovací činidlo DCC (*N,N'*-Dicyklohexylkarbodiimid). Vzniklý hydrogel

však vykazoval nízkou porozitu, která by neumožňovala růst kmenových buněk. Tento problém byl vyřešen díky metodě lyofilizace. Jednalo se o prudké ochlazení na teplotu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následnou sublimaci rozpouštědla při teplotě $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Díky tomu byl připraven vysoce porézní hydrogel, který po osazení a kultivaci buňkami vazivové tkáně (fibroblasty) bylo možné využít k náhradě poškozené tkáně.



Obr. 9 Snímek hydrogelu ze SEM. Na levé části je patrná morfologie a pórovitost lyofilizovaného hydrogelu, pravá část obrázku znázorňuje kultivaci buněk na jeho povrchu [29].

Vysoce porézní 3D hydrogely lze využít v celé řadě aplikací, ať už jako náhrada kostí, či vazivové tkáně. Lze však nalézt i případy, kdy takový hydrogel použít nelze a zde naopak přichází na řadu injektabilní in situ hydrogely. Přípravou těchto hydrogelů se zabýval kolektiv autorů kolem prof. Tana z Pittsburské univerzity [30]. K jejich přípravě použili chitosan v kombinaci s kyselinou hyaluronovou resp. její sodnou solí. Jedná se o látku tělu vlastní, která je součástí extracelulární matrix. V porovnání s postupem přípravy hydrogelu uvedeném výše, tito vědci nevyužili žádného síťovacího činidla a naopak se zaměřili pouze na interakci kladně nabitého chitosanu se záporně nabitým hyaluronátem. Vzniklý hydrogel sice nevykazoval přílišnou pevnost, avšak právě pro injektabilní aplikace je tato pevnost naprosto postačující. Připravený hydrogel byl osazen chondrocyty a tento scaffold byl určen k injekční léčbě poškozené kolenní chrupavky. Výhodou této léčby je absence rozsáhlejších chirurgických zákroků.

Poměrně zajímavé jsou také studie zabývající se vlivem chitosanu na snižování hladiny cholesterolu v krvi. První zmínka o těchto možnostech aplikace chitosanu se objevila ve studii z roku 1993, kdy dospělému muži byl podáván chitosan v podobě potravinového doplňku po dobu dvou týdnů. První týden byla podávána dávka chitosanu v množství 3 g/den a druhý týden 6 g/den. Po uplynutí dvou týdnů byl zjištěn pokles celkového cholesterolu o 6 %. Jiná studie se zaměřila na studium obézních žen trpících hypercholesterolémií. Těmto ženám (84 studovaných subjektů) byl podáván mikrokrytalický chitosan v množství 1,2 g/den po dobu 8 týdnů. Po této době byl zjištěn významný pokles koncentrace LDL cholesterolu v krvi [17].

V biomedicínských aplikacích může být chitosan využit také jako obvazový materiál. Materiály na bázi chitosanu podporují hojení ran a chrání je před poškozením. Navíc antimikrobiální schopnosti chitosanu přispívají k ochraně před infekcí. I přesto, že není znám

přesný mechanismus antimikrobiálních schopností chitosanu, mnoho vědců se domnívá, že kladně nabitě aminoskupiny chitosanu reagují s opačně nabitými komponentami buněčných membrán mikroorganismů. Díky tomu jsou schopny pozměnit jejich propustnost a dochází tak k úniku intracelulárního obsahu do okolí a následnému rozpadu buněk. Navíc omezuje tvorbu fibroblastů, které se významně podílejí na vzniku zjizvené tkáně. Chitosanové přípravky tak lze použít i při léčbě popálenin [5].

S „tradičním“ způsobem léčby běžných povrchových poranění se setkal asi každý. Problém však nastává v případech, kdy jsou tato poranění rozsáhlejšího charakteru. Vytvoření strupu na povrchu rány často vede ke tvorbě jizev a to je jev, zejména v oblasti obličeje, rozhodně nežádoucí. Již mnoho let jsou komerčně dostupné hydrogely umožňující tzv. mokré hojení. Tento způsob léčby povrchových poranění sebou nese výrazné zkrácení doby úplné regenerace a v mnoha případech eliminuje vznik zjizvené tkáně. Jak již sám název mokré hojení napovídá, hlavní příčinou urychlené regenerace je neustálá hydratace poraněné tkáně. Miguel a kol. [31] se zabývali přípravou hydrogelu, který by měl umožnit výživu poškozené části kůže a naopak zabránit mikrobiálnímu znečištění či tvorbě zánětu. Toho je docíleno právě využitím chitosanu, který má významné antibakteriální účinky. Základ hydrogelu zde tvoří agaróza. Jedná se o termoreverzibilní polysacharid, který při teplotě nižší než 40 °C tuhne a vytváří rozsáhlou makromolekulární síť. Stejně jako u většiny aplikací i zde dochází k postupné enzymatické degradaci chitosanu vlivem enzymu lysozymu a díky tomu je zajištěna biodegradabilita použitého hydrogelu.

Již několik let lze na trhu najít tzv. samovstřebávací chirurgické nitě, které jsou založeny na přítomnosti chitosanu. Poskytují vysokou pevnost a zároveň díky biodegradabilitě předcházejí vzniku jizev. V neposlední řadě má chitosan ideální vlastnosti pro výrobu kontaktních čoček. Výhodou těchto čoček je dobrá optická průchodnost, jsou mechanicky stabilní a snadno propouští kyslík [32].

3.3 Azobarviva

Azobarviva tvoří téměř polovinu všech syntetických barviv, které se využívají k barvení textilií, potravin, papíru, inkoustů, kůže a kosmetických přípravků. To představuje obrovskou zátěž pro životní prostředí a pro velké množství živočichů. Jak udávají některé studie, je každoročně vypouštěno do životního prostředí více jak 50 000 tun barviv z průmyslových továren. Jedná se o poměrně jednoduché indikátory znečištěné vody, jelikož některá barviva jsou viditelná již při koncentracích 0,005 mg/dm³. Odhaduje se, že 10 – 15 hm. % barviv se v procesu barvení neváže na textilní vlákna a výrazně zatěžuje ekosystém. Z obrovského množství azobarviv používaných v průmyslu připadá největší podíl barviv na textilní průmysl, a to přibližně 80 %. Přítomnost těchto barviv v ekosystému je také příčinou závažných zdravotních onemocnění živočichů. Nejedná se pouze o toxicitu samotných barviv, ale často právě rozkladné produkty mají toxické či mutagenní účinky na živé organismy. V mnoha průmyslových odvětvích se stále více využívá barviv, která jsou charakteristická přítomností jedné či více azoskupin. Azobarviva jsou totiž poměrně chemicky stabilní a jejich příprava v současnosti zahrnuje relativně jednoduché syntetické kroky.

3.3.1 Fyzikálně-chemické metody dekolorizace roztoků azobarviv

Největší problém současnosti představuje odstraňování azobarviv z životního prostředí. Tento proces se někdy označuje pojmem *dekolorizace*. Je popsáno mnoho fyzikálně-

chemických metod, jako je adsorpce, iontová výměna, či některé chemické metody dekolorizace. Problémem však zůstává vysoká cena a často nízká efektivnost těchto metod. Jednou z hojně využívaných technik je tzv. koagulace či flokulační techniky. Jejichž cílem je generovat velké množství kalu, který sedimentuje a je pak bezpečně odstraněn. Adsorpční techniky umožňují dekolorizaci širokého spektra barviv, avšak mohou vést ke vzniku sekundárních odpadů, které musí být dále zpracovávány.

3.3.2 Biologické metody dekolorizace roztoků azobarviv

K poměrně novým a intenzivně studovaným metodám dekolorizace patří tzv. biologické metody. Různé skupiny mikroorganismů, jako jsou bakterie, houby, kvasinky, nebo řasy jsou schopné degradovat azobarviva za aerobních i anaerobních podmínek. Většina azobarviv se neštěpí v přítomnosti kyslíku, ale jsou štěpeny za anaerobních podmínek působením mikroorganismů na aromatické aminy, které jsou dále rozkládány za přítomnosti kyslíku. V přítomnosti kyslíku je rozklad azobarviv málo účinný, jelikož kyslík je silnějším akceptorem elektronu než azobarviva. Některé biologické metody dekolorizace jsou založeny na přítomnosti enzymů syntetizovaných mikroorganismy. Působení enzymů je však účinné pouze na některá azobarviva.

Jednou z nejvýznamnějších skupin enzymů využívaných k dekolorizaci patří azoreduktázy. Jedná se o enzym obsažený u některých druhů bakterií a hub, který je schopen odbarvovat, resp. štěpit, některá azobarviva na odpovídající aminy, které tvoří bezbarvé produkty. Pomocí spektrofotometrických metod tak lze snadno pozorovat účinnost těchto enzymů. Azoreduktázy katalyzují reakce pouze v přítomnosti redukčních činidel, jako je NADH, NADPH a FADH₂. Tato redukční činidla působí jako donor elektronů a mohou se tak zapojovat do mechanismu rozpadu azo vazby na intramolekulární i extramolekulární úrovni [33].

3.3.3 Chicago sky blue 6B

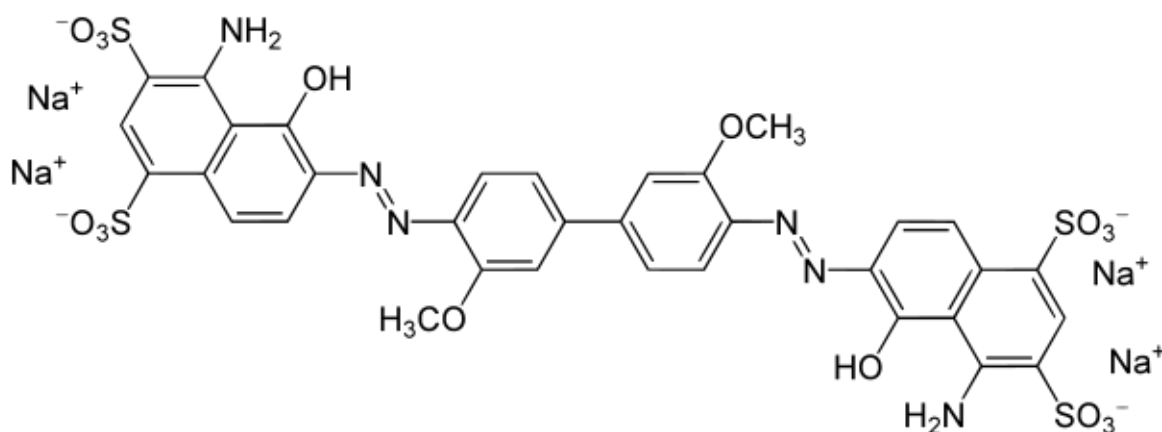
Toto barvivo patří do rozsáhlé skupiny tzv. přímých (z eng. direct) barviv. Obecně se jedná o velká azobarviva, obsahující dvě a více azo-skupin. Tato barviva jsou charakteristická přítomností sulfonových skupin a dobrou rozpustností ve vodě. Jejich pojmenování souvisí se snadnou sorpcí na substrát, který nejčastěji tvoří celulóza. Tato vlastnost pak umožňuje přímé barvení substrátu pomocí jednoduchých adsorpčních procesů na základě silných intermolekulárních interakcí se substrátem.

Hlavní aplikace přímých azobarviv je v textilním a papírenském průmyslu, avšak tyto látky mohou mít vysoký aplikační potenciál i ve farmaceutickém průmyslu. Zejména při léčbě DNA a neurodegenerativních chorob, jako je např. Alzheimerova choroba atd.

Chicago sky blue 6B (Obr. 10), někdy také známé pod pojmem Direct blue 1 je azobarvivo, které se poměrně často využívá v textilním průmyslu k barvení bavlny, viskózy, hedvábí, nylonu a řady dalších textilií. Je dobře rozpustné ve vodě a to v koncentraci až 50 g·dm⁻³. Díky tomu může být využito i v papírenském průmyslu k barvení vláken celulózy [34].

Kromě průmyslového využití v podobě barvení, může být toto barvivo aplikováno i ve farmaceutickém průmyslu. Kolektiv autorů kolem prof. Zongshenga z Pekingské univerzity [35] se zabýval účinky Chicago sky blue 6B na tzv. vezikulární glutamátové transportéry

(VGLUTs). Tyto transportéry jsou schopné inhibovat hyperaktivitu způsobenou metamfetaminem a tlumí tak následky chování způsobené touto návykovou látkou. Vědci se zaměřili na studium myši, kterým jedenkrát denně podávali dávku $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ metamfetaminu. Polovině z celkového množství myši bylo navíc podáváno i $7,5 \mu\text{g}$ barviva. Hyperaktivita způsobená metamfetaminem byla určována na základě uběhnuté vzdálenosti po dobu jedné hodiny. Výsledky studie jasně potvrdili, že u myši, kterým bylo kromě metamfetaminu podáváno i barvivo Chicago sky blue 6B, byla uběhnutá vzdálenost po dvoutýdenním experimentu téměř o třetinu nižší.

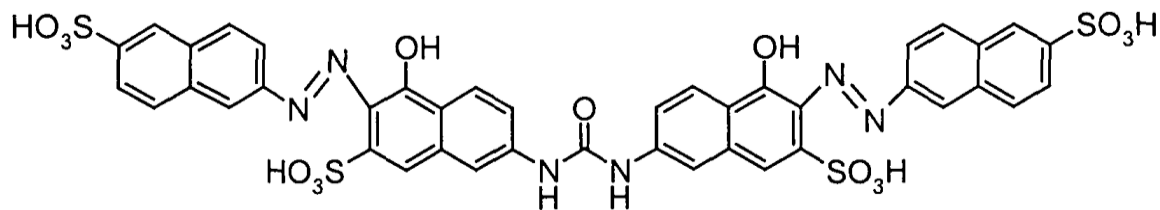


Obr. 10 Struktura azobarviva Chicago sky blue 6B C.I. 24 410 [35].

3.3.4 Sirius red F3B (Saturnová červen F3B)

Jedná se o polyazobarvivo, známé také jako Direct red 80. Toto barvivo bylo poprvé popsáno již v roce 1924, a to jako textilní barvivo. Jeho schopnosti barvit biologické tkáně byly popsány o čtyřicet let později v roce 1964. Jeho využití v průmyslových aplikacích je zejména v barvení textilií, papíru a kůže. Při své degradaci, v porovnání s většinou ostatních přímých barviv, neuvolňuje karcinogenní derivát anilinu benzidin. Díky tomu je jeho používání výrazně bezpečnější, než jiná barviva. Prášková forma tohoto barviva je charakteristická intenzivně červeným, až hnědočerveným zbarvením.

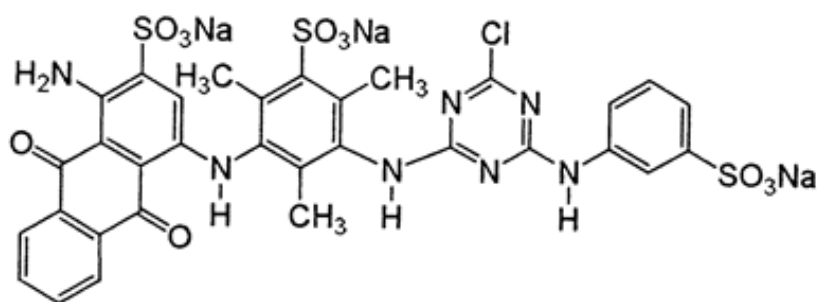
Z hlediska výzkumu je daleko významnější jeho aplikace v oblasti barvení živočišných tkání. Díky tomu si našlo významné postavení zejména v oboru tzv. histopatologie. Zde má dvě hlavní využití. Jednak je toto barvivo schopno intenzivně barvit kolagenová vlákna (především v nasyceném roztoku kyseliny pikrové) a jednak je schopno barvit amyloid (jedná se o protein, jehož prekuzory mohou být indikátorem různých nemocí, např. Alzheimerova nemoc, Parkinsonova choroba atd...). V obou případech histologického využití barviva Sirius red jsou barvené struktury intenzivně červené, což umožňuje jejich identifikaci v optickém mikroskopu [36].



Obr. 11 *Sirius red (Direct red 80) C.I. 35 780* [36].

3.3.5 Reactive blue 49 (Ostazinová modř H-3R)

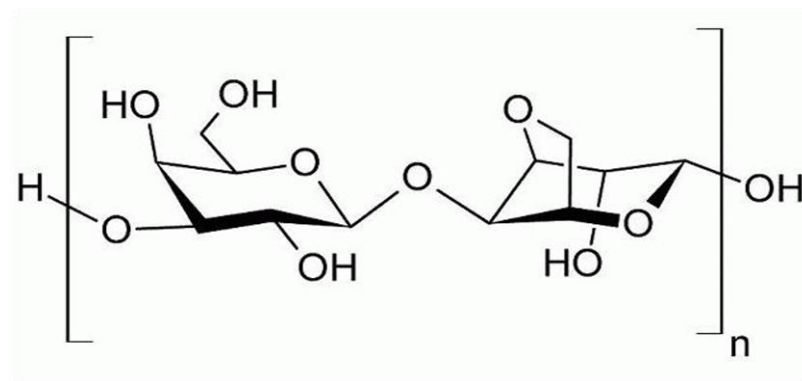
V porovnání s předchozími barvivy se nejedná o azobarvivo, ale o tzv. antrachinonové barvivo. Tato barviva jsou deriváty antrachinonu, neboli antracen-9,10-dionu. Reactive blue 49 je barvivo využívané jak v textilním, tak i papírenském průmyslu. I přes odlišnou strukturu v porovnání s přechodnými azobarvivy vykazuje díky přítomnosti sulfonové skupiny podobnou reaktivitu. Jedná se o anionaktivní barvivo, které je charakteristické poměrně silnou adsorpcí na textilní vlákna a intenzivně modrým zbarvením. Výhodou tohoto barviva je jeho rozpustnost, která je téměř $200 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Struktura barviva je znázorněna na obrázku níže (Obr. 12) [37].



Obr. 12 *Reactive blue 49 C.I. 621526* [37]

3.4 Agaróza

Jedná se o lineární polysacharid, který je díky svým schopnostem tvořit čirý gel známý již po staletí. Z chemického hlediska se jedná o termoreverzibilní polysacharid, který je tvořen jednotkami agarbiózy. Ta je složena z navzájem se opakujících podjednotek galaktózy a 3,6-anhydrogalaktózy (Obr. 13). Agaróza je vhodná ke studiu řady látek a to především díky dobré optické průchodnosti. Navíc se jedná o prakticky nenabíjí polysacharid. Díky tomu lze předpokládat nízkou afinitu k interakcím agarózy s použitými látkami (v případě předložené práce s barvivy) a nedochází tak k negativnímu ovlivňování experimentů. Agaróza se v přírodě vyskytuje ve formě agaru, který je součástí buněčné stěny mořských řas typu *Agarophyte* [38].



Obr. 13 Strukturní vzorec agarózy [39].

V komerční sféře lze nalézt velké množství nejrozličnějších druhů agarózy. Díky rozdílným vlastnostem se pak hodí na různé aplikace. Jedním z podstatných parametrů, které charakterizují jednotlivé typy agarózy, je teplota tání. Některé druhy, označované jako tzv. *low melting point* jsou ve vodných roztocích rozpustné při teplotě nižší než 65 °C. Naopak *high gelling temperature* agaróza je rozpustná až při teplotě přesahující 95 °C. Nejčastěji používané druhy agarózy jsou však rozpustné při teplotě 85 °C. Po následném ochlazení roztoku agarózy na teplotu nižší než 40 °C (u *high gelling temperature* nižší než 42 °C) dochází ke tvorbě gelu [40].

Teplota gelace je však silně závislá na množství methoxylových a sulfátových skupin. Díky tomu lze na trhu nalézt různě modifikované formy agarózy. Jak už bylo zmíněno, jedná se o termoreverzibilní polysacharid. Opětovným zahřátím gelu dochází ke vzniku solu. Proces gelace je úzce spjat se změnou struktury agarózy, kdy dochází k nárůstu dvojité helikální struktury a následnému vzniku třídimenzionálních sítí. U agarózy taktéž jako u většiny gelů dochází v důsledku stárnutí gelu ke snižování jeho objemu, což má za následek samovolné vytlačování kapaliny na povrch gelu. Tomuto jevu se říká *synerese* a poměrně často se vyskytuje u nově vzniklých systémů, které nejsou v termodynamické rovnováze [41].

3.4.1 Využití agarózy

Agaróza je hojně využívána především v biochemii a analytické chemii, kde se hydrogel využívá jako nosné médium pro gelovou elektroforézu. Agarózové hydrogely vykazují nízkou afinitu k interakcím s ostatními látkami a proto je lze využít v gelové elektroforéze k separaci nukleových kyselin. Zároveň se agarózový hydrogel vyznačuje dobrou vodivostí, která je nezbytná pro gelovou elektroforézu. Jedná se totiž o pohyb záporně nabitých iontů ve třídimenzionální agarózové síti směrem ke katodě, a to vlivem elektrického pole. Pro separaci různě velkých molekul je však důležité zvolit vhodnou koncentraci gelu. Čím vyšší je koncentrace agarózy, tím je menší velikost pórů uvnitř gelu a rychlost pohybu separovaných molekul se sníží. Agaróza může být využita i v podobě stacionární fáze v gelové permeační chromatografii [38].

V různých odvětvích průmyslu se využívá odlišně koncentrovaných agarózových gelů. Například v potravinářství jsou využívány spíše méně koncentrované gely. Naopak farmaceutický a mikrobiologický průmysl využívá spíše koncentrovanější gely, které vykazují

vyšší odolnost. Díky svým mechanickým vlastnostem, zejména křehkosti, má agaróza v některých odvětvích omezené využití.

Široké využití má agaróza také v oblastech farmacie a mikrobiologie. Díky vysokému obsahu vody (v řadě případů až 99 hm. %), je vhodným nosičem pro růst mikroorganismů, jelikož přítomná voda zajišťuje jejich výživu. Agarózový hydrogel lze (obdobně jak tomu bylo v případě chitosanu) využít i jako *scaffold* ve tkáňovém inženýrství. Hydrogel poskytuje buňkám mechanickou oporu a přítomná voda je nezbytná pro růst buněk, či samotných tkání [42].

Neméně důležitou oblastí chemie, kde se lze setkat s používáním agarózy, je fyzikální chemie. Vhodných mechanických i optických vlastností agarózových hydrogelů lze využít ke studiu biopolymerů a řady dalších látek. Jak bylo zmíněno v úvodu, nesmírnou výhodou pro použití agarózy k tomuto účelu je velmi nízká afinita k interakcím se studovanými látkami. Nedochází tak k ovlivňování samotných procesů, například difúze. Právě pomocí difúzních experimentů lze studovat reaktivitu řady látek v hydrogelové fázi. Pro tyto experimenty je možné připravit hydrogelová média o konkrétních požadovaných rozměrech a vlastnostech. Výsledky měření pak lze snadno aplikovat na matematické či fyzikální teoretické modely [43].

3.5 Gelové systémy

3.5.1 Disperzní systém

Je tvořen soustavou, která obsahuje alespoň dva druhy hmoty (složka nebo fáze), přičemž jeden druh hmoty je rozptýlen ve druhém, a to ve formě více či méně jemných částic. Druh, který je rozptýlený, se nazývá *disperzní podíl* a naopak spojitý druh je *disperzní prostředí*. Existuje mnoho typů disperzních soustav, rozdělovaných podle různých hledisek:

- podle počtu fází se dělí na systémy:
 - *homogenní* – disperzní podíl i disperzní prostředí tvoří jednu fázi
 - *heterogenní* – disperzní podíl je od disperzního prostředí oddělen fázovým rozhraním

Podle skupenství disperzního prostředí a disperzního podílu bývají heterogenní systémy dále děleny:

Tab. 1 Dělení dle skupenství disperzního prostředí [44]

Disperzní prostředí	Disperzní podíl	Disperze	
		koloidní	tuhé
plynné	plynný	–	–
	kapalný	aerosoly (mlhy)	déšť, mlhy
	tuhý	aerosoly (dýmy)	prach, dýmy
kapalné	plynný	pěny	bubliny, pěny
	kapalný	emulze	emulze
	tuhý	lyosoly	suspenze
tuhé	plynný	tuhé pěny	tuhé pěny, minerály s uzavřenými plyny
	kapalný	tuhé emulze	tuhé emulze, minerály s kapičkami
	tuhý	tuhé soly	tuhé směsi

- podle tvaru částic:
 - *globulárně disperzní* – s izometrickými částicemi
 - *laminárně disperzní* – s anizometrickými částicemi, jejichž jeden rozměr je řádově menší než ostatní
 - *fibrálně disperzní* – s anizometrickými částicemi, jejichž jeden rozměr je řádově větší než ostatní
- podle velikosti částic disperzního podílu:
 - *hrubé disperze* – $d > 10^{-6}$ m
 - *koloidní disperze* – 10^{-9} m $< d < 10^{-6}$ m
 - *analytické disperze* – $d < 10^{-9}$ m (pravé roztoky)
- podle počtu molekul v částici disperzního podílu na:
 - *molekulární systémy* – analytické disperze a roztoky makromolekul
 - *polymolekulární systémy* – asociativní koloidy, lyofobní soly a hrubé disperze
- podle struktury disperzního podílu:

- na systémy s disperzním podílem ve formě částic
- na systémy, u nichž částice disperzního podílu vytvářejí souvislou prostorovou síť, která prostupuje kapalným disperzním prostředím (gely)
- podle rozdělení velikosti částic:
 - *monodisperzní* – s částicemi stejné velikosti
 - *paucidisperzní* – obsahují několik velikostních frakcí částic
 - *polydisperzní* – obsahují částice mnoha různých velikostí

3.5.2 Gel

Tímto pojmem je označován systém, který je tvořen třídimenzionální sítí. Tato síť má souvislou strukturu a prostupuje celým disperzním prostředím. Disperzní částice nejsou schopny v síťové struktuře nezávislého pohybu. Pojem gel se nejčastěji uvádí v souvislosti se systémem, kde je disperzní prostředí kapalné (takový typ gelu je označován jako *lyogel*). V širším smyslu lze mezi gely zařadit také *xerogely*. Ty vznikají při odstranění disperzního prostředí, tudíž vysušením. Disperzní částice tvořící síťovou strukturu gelu mají nejčastěji velikost koloidů (1 – 500 nm).

3.5.3 Dělení gelů

Způsoby klasifikace gelů:

- podle chemického složení disperzního podílu:
 - *anorganické*
 - *organické*
- podle charakteru disperzního prostředí:
 - *hydrogely* – vodné disperzní prostředí
 - *organogely* – disperzní prostředí je tvořené organickým rozpouštědlem (etanol)
- podle chování ve vysušeném stavu
 - *reverzibilní gely* – jsou to gely, které při vysoušení zmenšují svůj objem a dávají vznik kompaktním xerogelům. Zároveň však jsou schopny přecházet zpět do původního stavu přijetím disperzního prostředí (např. vody), tzv. botnáním gelu. Reverzibilní gely vznikají nejčastěji z roztoků lineárních polymerů (např. agarózy) nebo botnáním xerogelů. Proces vzniku gelu se nazývá gelace.
 - *ireverzibilní gely* – ve vysušeném stavu mají prakticky totožný objem, avšak jejich struktura má porézní charakter. Při kontaktu s disperzním prostředím jsou schopny absorbovat určité množství kapaliny, avšak nedochází ke vzniku lyogelu. Změna ireverzibilního gelu na xerogel je tedy nevratná. Jedním ze způsobů vzniku ireverzibilního gelu je gelace lyofobních solů. Jedná se o pomalý proces, při němž sol přechází na gel přes viskózní, polotuhá stádia. Proto je přesné vystižení okamžiku, kdy sol úplně ztuhl, nebo gel roztál velmi obtížné. Tato teplota je označována *bodem gelace* a bývá zjišťována pomocí magnetoreometru (kulička vlivem magnetického pole osciluje a gelací se kmity zcela utlumí).

- podle povahy sil, které drží síťovou strukturu pohromadě:
 - *fyzikálně síťované gely* – vznikají z roztoku polymerů sdružováním do útvarů, které tvoří funkci uzlů. Toto sdružování se realizuje působením fyzikálních sil mezi jednotlivými úseky makromolekulárních řetězců. Ty jsou zpravidla v jednom, dvou nebo i třech rozměrech větší, než kovalentní uzly. Makromolekuly se mohou díky své délce začlenit do více uzlových oblastí. Díky tomu pak dochází ke střídání zapojených částí s volnými úseky, které si díky tomu zachovávají svou ohebnost a tepelný pohyb. Ve srovnání s kovalentními uzly nelze zanedbat skutečnost, že jejich uzly mohou v čase zanikat a v jiném uspořádání zase vznikat, zatímco kovalentní uzly se pokládají za nekonečně trvanlivé.
 - *gely s kovalentními vazbami* – představují nekonečnou trojrozměrnou síťovitou strukturu, která je tvořena chemickými vazbami. Struktura kovalentně síťovaných gelů je poměrně pevná. Rozdíl mezi fyzikálně síťovanými gely popsán výše [44].

3.5.4 Vlastnosti gelů

- mechanické vlastnosti – i přes majoritně zastoupené kapalně disperzní prostředí mají gely v důsledku svého uspořádání mechanické vlastnosti charakteristické pro tuhý stav. Do určité míry jsou schopné odolávat tečnému napětí. Pod tuto hodnotu se chovají jako elastická tělesa. Hodnota kritického napětí je převážně závislá na pevnosti jednotlivých vazeb a jejich koncentraci uvnitř gelu. Mezi značně elastické gely patří především reverzibilní gely, které jsou tvořeny kovalentními spoji. Tato elasticita je dána malým počtem vazeb v objemu. Čím více vazeb je v řetězci polymeru přítomných, tím menší je možná změna tvaru molekuly a prostorová síť je tak více rigidní.
- elektrická vodivost a difuzivita – pohyb iontů a malých molekul v disperzním prostředí mezi síťovým disperzním podílem je téměř stejně rychlý, jako v odpovídajícím solu. Z toho plyne i elektrická vodivost, která v případě gelů obsahujících jako disperzní prostředí nízkomolekulární elektrolyty je tedy stejně vysoká jak v solu. Difuzivita nízkomolekulárních látek je v gelu mírně nižší, než v solu ze kterého gel vznikl. Díky struktuře gelu není difuzivita nízkomolekulárních látek ovlivňována prouděním, ani tepelnými konvencemi.
- stárnutí gelů – u gelů, které jsou čerstvě připraveny a nejsou v termodynamické rovnováze, narůstá s časem i počet spojů. Tím dochází ke smršťování struktury a vytlačování části disperzního prostředí ven z gelu. Obdobně, jak bylo zmíněno v případě agarózy (kapitola 3.4), dochází k jevu zvanému *synereze* [45].

3.6 Difúze

Obecně je pojem difúze nejčastěji spojován s procesem, při kterém dochází k samovolnému pohybu částic mikroskopických rozměrů. Na základě Brownova pohybu dochází k vyrovnávání koncentrací v prostředí, které obsahuje koncentrační gradient. Ačkoliv z mikroskopického hlediska se pohyb částic jeví nahodile, navenek je pozorován pouze pohyb částic z místa o vyšší koncentraci do místa o nižší koncentraci [46].

Hnací silou difúze je rozdíl koncentrací transportované látky ve sledovaném prostředí. Ze spojení prvního a druhého zákona termodynamiky plyne, že za konstantního tlaku a teploty je

Gibbsova energie rovna maximální práci dw (jiné než objemové), kterou může vykonat jeden mol látky při transportu z místa o chemickém potenciálu μ do místa s chemickým potenciálem $\mu + d\mu$. V systému, kde chemický potenciál je závislý na prostorové souřadnici x , dostáváme [47]:

$$dw = \left(\frac{\partial \mu}{\partial x} \right)_{p,T} dx \quad (2)$$

a po porovnání rovnice (2) s teoretickým předpokladem vyjádřením práce:

$$dw = -Fdx \quad (3)$$

kde F je síla působící v opačném směru. Spojením rovnic (2) a (3) lze gradient chemického potenciálu za konstantní teploty a tlaku zapsat jako sílu, která působí v opačném směru na jeden mol částic, protože platí rovnice (4).

$$F = - \left(\frac{\partial \mu}{\partial x} \right)_{p,T} \quad (4)$$

Tato síla vyjadřuje spontánní tendenci částic k rozptýlení. Dle druhého zákona termodynamiky její podstata spočívá v tom, že systém zvyšuje svou míru neuspořádanosti, čímž dospěje do určitého stavu, který má nejnižší vnitřní energii [48].

Velmi často dochází k vzájemné difúzi látky a rozpouštědla. Tento proces je označován pojmem *binární difúze*. Při ní nedochází pouze k difúzi jedné látky do druhé, ale tento proces je vzájemný.

Vzhledem k tomu, že tepelný pohyb probíhá i v čistých látkách (případně rovnovážných směsích), definuje se tzv. *samodifúze*. Ta charakterizuje pohyb molekuly látky v prostředí o nulovém koncentračním gradientu. Speciálním příkladem pak je velmi nízká koncentrace námi sledované látky v rovnovážném roztoku. V tomto případě hovoříme o *difúzi označených molekul* (to souvisí s měřením difúze u radioaktivně označených molekul studované látky v roztoku). Samodifúze se jeví jako vhodný prostředek pro studium transportních jevů, jelikož měření probíhá v těch směsích, u nichž bylo právě dosaženo rovnováhy.

Pro různá prostředí je rychlost difúze velmi odlišná (viz Tab. 2). V roztocích polymerů je rychlost difúze řádově mezi rychlostí v kapalinách a pevných látkách. Je závislá na mnoha faktorech, především tlaku, teplotě, viskozitě difúzního prostředí a velikosti pohybující se molekuly [49].

Tab. 2 Řádová rychlost difúze v různých fázích prostředí [49]

Difúzní prostředí	Rychlost řádově [$\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$]
Plynné	10
Kapalné	0,05
Pevné	10^{-5}

3.6.1 Fickovy zákony

Německý fyziolog Adolf Eugene Fick si jako první všiml určité podobnosti mezi vedením tepla ve vodiči (kondukcí) a difúzí, tedy neuspořádaným molekulárním pohybem. Na základě těchto znalostí definoval Fick dva zákony. První z nich definuje souvislost mezi rychlostí přenosu látky pomocí difúze a koncentračním gradientem v určitém místě. Druhý zákon pak popisuje rychlost změny koncentrace v konkrétním místě způsobenou difúzí, jenž je úměrná změně koncentračního gradientu vyskytující se v tomto místě. Konstantou této úměrnosti je tzv. *difúzní koeficient* D [48] a [49].

3.6.1.1 1. Fickův zákon

Jednorozměrný difúzní tok J_1 [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] definoval jako:

$$J_1 = A \cdot j_1 = A \cdot D_1 \cdot \frac{\partial c_1}{\partial x}, \quad (5)$$

kde symbol A znázorňuje velikost plochy, přes kterou látka difunduje, j_1 je difúzní tok přes jednotkovou plochu, c_1 představuje molární koncentraci látky a x je vzdálenost. Difúzní koeficient D udává míru mobility molekul v dané látce a je přímo úměrný difúznímu toku. Difúzní koeficient se někdy nahrazuje pojmem difuzivita, avšak jedná se o stejnou veličinu, udávanou v jednotkách $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Obdobně jak bylo zmíněno výše u samodifúze, je difúzní koeficient závislý na tlaku, teplotě a velikosti difundovaných částic.

V případě *binární difúze* platí, že existuje-li koncentrační gradient první složky způsobující její difúzní tok, musí v ustáleném stavu zároveň existovat i koncentrační gradient druhé složky, který má shodnou velikost. Ten způsobuje difúzní tok druhé složky v opačném směru. Z tohoto důvodu je jedna rovnice popisující difúzní tok jedné látky v daném systému dostačující. Obecně lze tedy 1. Fickův zákon zapsat ve tvaru:

$$j_1 = -D_1 \cdot \text{grad } c_1 \quad (6)$$

kde difúzní tok má vektorový charakter a je roven množství látky přenesené přes jednotkový objem za jednotku času. Jeho rozměr je tedy $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Jelikož difúze probíhá proti směru koncentračního gradientu, je na pravé straně rovnice (6) záporné znaménko [49].

3.6.1.2 2. Fickův zákon

Popisuje nestacionární difúzi v systémech, kde dochází ke změně koncentrace difundující látky s časem. Pokud D není funkcí c lze ho obecně zapsat ve tvaru:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = \text{div}(D \cdot \text{grad } c_1) = D \cdot \text{div grad } c_1 \quad (7)$$

Tento zápis rovnice je zcela nezávislý na souřadnicovém systému a rovnice může být vyjádřena pro různé souřadnicové systémy (např. cylindrický, sférický a karteziánský). Nestacionární difúzi ve směru osy x lze zapsat ve tvaru (pouze v případě, že je zanedbána nucená konvence a D není funkcí c):

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} + \frac{1}{A} \cdot \frac{\partial A}{\partial x} \cdot \frac{\partial c_1}{\partial x} \right) \quad (8)$$

je-li plocha A neměnná, lze výraz zapsat ve tvaru:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} \quad (9)$$

Vyjádření difúzních procesů je často totožné s procesy vedením tepla. Proto lze tuto rovnici při shodně zadaných podmínkách převést na úlohy zabývající se difúzní problematikou a naopak [47].

3.6.2 Jednoduché difúzní modely

Britský fyzik a matematik John Crank se zabýval řešením difúzních modelů a významně se podílel na vytvoření jejich databáze. Vzhledem k jejich složitosti se často využívá zjednodušených modelů. Mezi nejjednodušší modely nepochybně patří *difúze skrz tenký film* a *volná difúze* [50].

3.6.2.1 Difúze skrz tenký film

Metoda je založena na ustálené, časově neměnné jednosměrné difúzi mezi dvěma dobře míchanými roztoky o odlišných koncentracích c_1 a c_2 . Proces difúze probíhá skrz tenkou bariéru a dostatečně dlouho, aby nedocházelo k akumulaci látky v bariéře. Díky tomu lze tvrdit, že nedochází ke hromadění difundované látky v bariéře. Tok látky do bariéry je tedy totožný s tokem látky z bariéry. Jedná se o ustálenou difúzi a druhý Fickův zákon pak přechází do tvaru:

$$0 = D \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}. \quad (10)$$

Matematickou úpravou pro film o tloušťce l a okrajové koncentrace ve filmu $c_1 = c_{10}$ pro $x = 0$ a $c_1 = c_{1l}$ pro $x = l$, získáváme řešení:

$$c_1 = c_{10} + (c_{1l} - c_{10}) \cdot \frac{x}{l} \quad (11)$$

$$j_1 = -D \frac{\partial c_1}{\partial x} = \frac{D}{l} (c_{10} - c_{1l}). \quad (12)$$

Z předchozích rovnic je zřejmé, že koncentrační profil látky ve filmové bariéře je lineární a je závislý pouze na okrajových koncentracích a tloušťce filmu. Jelikož difúzní tok není závislý na čase, dochází s rostoucím časem k nárůstu celkového transportovaného množství látky s časem.

Při membránové difúzi existuje rovnováha mezi koncentrací transportované složky ve filmu a v roztoku a je popsána tzv. *rozdělovacím koeficientem* ε . Okrajové podmínky difúze jsou pak $c_1 = \varepsilon \cdot C_{10}$ pro $x = 0$ a $c_1 = \varepsilon \cdot C_{1l}$ pro $x = l$. C_{10} a C_{1l} jsou koncentrace jednotlivých roztoků oddělených filmem. Rovnice (10) pak přechází do tvaru:

$$c_1 = \varepsilon \cdot C_{10} + \varepsilon \cdot (C_{1l} - C_{10}) \cdot \frac{x}{l}. \quad (13)$$

3.6.2.2 Volná difúze

V případě tohoto modelu je difúzní prostor tak dlouhý, že difundující částice nejsou schopny dosáhnout za měřený čas jeho konce. Této podmínce je tedy nutné přizpůsobit i experimentální provedení, například difúze v plastových kyvetách v hydrogelu.

Na počátku experimentu obsahuje měřené médium konstantní koncentraci látky 1. Nárůstem její koncentrace na rozhraní dojde k vytvoření koncentračního gradientu, který způsobí difúzi do média. Díky tomu dochází ke vzniku časově proměnného koncentračního profilu látky 1 v médiu. Účelem měření je zjistit, jak se mění koncentrační profil difundující látky s časem a se změnou koncentrace na rozhraní [49].

Pro počáteční podmínku $t = 0$ pro všechna x je $c_1 = c_{1\infty}$ a okrajové podmínky $t > 0$ pro $x = 0$ je $c_1 = c_{10}$ a pro $x = \infty$ je $c_1 = c_{1\infty}$ lze úpravou Fickových zákonů získat rovnice:

$$\frac{c_1 - c_{10}}{c_{1\infty} - c_{10}} = \operatorname{erf} \frac{x}{\sqrt{4D_1t}}, \quad (14)$$

$$j = \sqrt{\frac{D_1}{\pi \cdot t}} \cdot (c_{10} - c_{1\infty}) \cdot \exp\left(-\frac{x^2}{4 \cdot D_1 \cdot t}\right). \quad (15)$$

Difúzní tok je u volné difúze funkcí času a plochy. U difúze v tenkém filmu při zdvojnásobení D vzroste difúzní tok dvakrát, u volné difúze vzroste difúzní tok na $\sqrt{2}$ násobek [50].

3.6.3 Složitější difúzní model – difúze s chemickou reakcí

Tento model v porovnání s předchozími modely uvažuje situaci, kdy mezi sebou difundující složky interagují. Časová změna koncentrace difundující látky je pro případ difúze s chemickou reakcí vyjádřena rovnicí [50]:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = -\frac{\partial j_1}{\partial x} + r_1. \quad (16)$$

Po dosazení difúzního toku do rovnice (7) získáme tvar rovnice:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D_1 \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} + r_1, \quad (17)$$

kde r_1 je rychlost vzniku látky 1 (nebo zániku látky 2), která je způsobena chemickými reakcemi v systému a za předpokladu, že uvažujeme jednotkový objem a proces trvající jednotku času. Taková rychlost může být vyjádřena reakcí 1. řádu:

$$r_1 = -\frac{\partial c_1}{\partial t} = \frac{\partial c_2}{\partial t} = k \cdot c_1, \quad (18)$$

kde k je rychlostní konstanta reakce 1. řádu a dosazením za r_1 do rovnice (16) získáme výraz:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D_1 \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - \frac{\partial c_2}{\partial t} = D_1 \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - k \cdot c_1. \quad (19)$$

V případě, že reakce v porovnání s procesem difúze probíhá mnohem rychleji, lze předpokládat vznik lokální rovnováhy mezi volnými a reakcí imobilizovanými složkami difundující látky:

$$c_2 = K \cdot c_1. \quad (20)$$

Rovnice (19) pak přechází do tvaru:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - K \cdot \frac{\partial c_1}{\partial t}, \quad (21)$$

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = \frac{D}{K+1} \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}, \quad (22)$$

který je obdobou 2. Fickova zákona a substitucí:

$$D_{\text{eff}} = \frac{D}{K+1}, \quad (23)$$

získáváme vztah pro tzv. *efektivní difúzní koeficient*, což je zdánlivý difúzní koeficient. Vztahy (14) a (15) se tedy mění pouze nahrazením difúzního koeficientu efektivním difúzním koeficientem. Ten totiž navíc zahrnuje i vliv chemické reakce, porozita prostředí a tortuozitu difundující látky. Chemická reakce nemění matematický popis volné difúze, ale mění pouze velikost difúzního koeficientu [48].

3.6.4 Difúzní koeficient a metody jeho stanovení

Přesné stanovení difúzního koeficientu je poměrně náročné. Pomocí jednoduchých laboratorních technik ho však lze určit s odchylkou 5 – 10 % od skutečné hodnoty [51]. Proto lze těchto technik využít například pro studium reaktivity některých látek, kdy se experimentálně zjistí difúzní koeficient. Na jeho základě pak lze částečně usuzovat o reaktivitě dané látky se zvoleným difúzním prostředím.

Nejčastěji se k měření změny koncentrace látky využívá analytických metod, převážně optických a spektrofotometrických. Pro jejich použití se při studiu difúzních procesů využívá modelových barviv, tzv. *sond*, které se vyznačují maximální (pro ně specifickou) hodnotou absorbance.

3.6.4.1 Metoda okamžitého plošného zdroje

Tato metoda je založena na nanesení poměrně malé množství látky v podobě tenkého filmu na rovný povrch difúzního prostředí, případně mezi dvě difúzní prostředí. To se v praxi realizuje např. vložením namočeného filtračního papíru mezi dvě nádoby s difúzním prostředím.

Počáteční podmínky znázorňuje tabulka níže (Tab. 3).

Tab. 3 Počáteční podmínky pro difúzi

čas	vzdálenost od rozhraní	koncentrace difundující látky
$t = 0$	$x = 0$	$c_1 = \frac{n_1}{\delta(x)A}$
$t = 0$	$-\infty < x < \infty$	$c_1 = 0$

Koncentrační profil za dobu t při difúzi v jednom směru je:

$$c_1 = \frac{n_1}{\sqrt{\pi Dt}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right) \quad (24)$$

a při symetrické difúzi do dvou totožných difúzních prostředí:

$$c_1 = \frac{n_1}{2\sqrt{\pi Dt}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right) \quad (25)$$

kde n_1 je množství látky nanesené v čase $t = 0$ na rozhraní.

Pro experimentální určení difúzního koeficientu je nezbytné zlogaritmovat vztah (24), čímž vznikne rovnice:

$$\ln c_1 = \ln \frac{n_1}{\sqrt{\pi Dt}} - \frac{x^2}{4Dt} \quad (26)$$

a vynesáním do grafu závislosti $\ln c_1$ na x^2 lze získat přímkou s rovnicí tečny:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{1}{4} Dt. \quad (27)$$

K použití řešení pro nekonečný systém musí být délka vzorku dostatečná na to, aby bylo množství difundující látky (které by se dostalo za konečný rozměr systému) zanedbatelné vůči celkovému množství [51] [52].

3.6.4.2 Metoda konstantního zdroje

Základ metody tvoří dostatečně velké difúzní médium, které je v přímém kontaktu se zdrojem difundující látky o neměnné koncentraci c_0 . Ta může být zajištěna například přidáním dostatečného množství látky do jejího nasyceného roztoku. Okrajové podmínky jsou:

Tab. 4 Okrajové podmínky metody konstantního zdroje

čas	vzdálenost od rozhraní	koncentrace difundující látky
$t = 0$	$x > 0$	$c_1 = 0$
$t > 0$	$x = 0$	$c_1 = c_{10}$

Druhý Fickův zákon pak přechází na tvar:

$$\frac{c_1}{c_{10}} = \operatorname{erfc} \frac{x}{\sqrt{4Dt}} = 1 - \operatorname{erf} \frac{x}{\sqrt{4Dt}} \quad (28)$$

množství prošlé látky rozhraním o jednotkové ploše za čas t je:

$$n_1 = 2c_{10} \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \quad (29)$$

a vynesáním do grafu závislosti n_1 na c_{10} lze získat přímkou, která má rovnici tečny:

$$\operatorname{tg} \alpha = 2 \sqrt{\frac{Dt}{\pi}}. \quad (30)$$

Pokud koncentrace látky v médiu není nulová, ale má hodnotu c_1 , mění se tvar rovnice na:

$$\frac{c_1 - c_{11}}{c_{10} - c_{11}} = \operatorname{erfc} \frac{x}{\sqrt{4Dt}}. \quad (31)$$

Z rovnice (28) pak lze určit difúzní koeficient [51] [52].

3.6.4.3 Metoda Stokesovy diafragmové cely

Jedná se o poměrně levnou a zároveň přesnou metodu určení difúzního koeficientu. Často se volí jako počáteční metoda při studiu difúzního chování látek. Nevýhodou je pak velká spotřeba objemu studované látky.

Diafragmovou celu tvoří dvě samostatné komory, které od sebe dělí porézní membrána či frit a jsou naplněny roztoky o rozdílných koncentracích. Analytickými metodami se pak měří koncentrace v různých časových intervalech a následně se vypočte difúzní koeficient ze vztahu:

$$D = \frac{1}{\beta \cdot t} \ln \left[\frac{(c_{1,\text{zdrojová}} - c_{1,\text{přijímac}})_0}{(c_{1,\text{zdrojová}} - c_{1,\text{přijímac}})_t} \right] \quad (32)$$

přičemž β [v cm^{-2}] je konstantou aparatury:

$$\beta = \frac{A}{l} \ln \left(\frac{1}{V_{\text{zdrojová}}} + \frac{1}{V_{\text{přijímac}}} \right). \quad (33)$$

kde A popisuje plochu, přes kterou difunduje látka, l je efektivní tloušťka membrány a V je objem diafragmové cely. Tuto konstantu je třeba nejprve experimentálně zjištit.

Důraz se klade především na délku experimentu a vlastnosti frity či membrány. To je závislé především na konkrétním experimentu a podle toho je nezbytné volit i časové intervaly pro měření koncentrace. Samozřejmě čím kratší intervaly, tím větší přesnost. To sebou ale nese daleko větší množství dat a s tím související obtížnější vyhodnocování [49] [53].

3.6.4.4 Metoda nekonečného páru

Nejčastější použití této metody je především pro studium difúze u pevných látek, případně roztoků na začátku oddělených přepážkou. Vzorek se skládá ze dvou částí o různých koncentracích. Obě části jsou na počátku experimentu spojeny a po určité době jsou od sebe odděleny a v různých polohách každé z částí jsou měřeny koncentrace. Z určeného koncentračního profilu a z celkového množství difundované látky skrz rozhraní je zjištěna hodnota difúzního koeficientu dle vztahů:

$$\frac{c_1 - \bar{c}_1}{c_{1\infty} - c_1} = \operatorname{erf} \frac{x}{\sqrt{4Dt}} \quad (34)$$

$$n_1 = \sqrt{\frac{4Dt_0}{\pi}} (\bar{c}_1 - c_{1\infty}) \quad (35)$$

kde $c_{1\infty}$ je počáteční koncentrace v cílové části, $\overline{c_1}$ je konečná koncentrace na rozhraní (daná aritmetickým průměrem c_1 a $c_{1\infty}$) n_1 je celkové množství látky transportované skrz rozhraní za čas t_0 [50].

4 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

4.1 Interakce chitosanu s barvivy

Naprostá většina experimentálních metod pro stanovení difúzních charakteristik chitosanu využívá modelových difúzních sond ve formě barviv. Přítomnost modelových barviv umožňuje spektrofotometrické stanovení jejich koncentrace v určitých časových intervalech. Díky tomu lze získat difúzní profil nezbytný pro stanovení difúzního koeficientu. Právě interakcí kationaktivního chitosanu s anionaktivními barvivy se zabývá mnoho vědců. Jak již bylo zmíněno v kapitole výše (kap. 3.2.5), chitosan se může vyskytovat v mnoha fyzikálních formách, které umocňují jeho použití v mnoha aplikacích, zejména při odstraňování barviv z odpadních vod. Právě studiem sorpčních vlastností chitosanu jakožto sorbentu při odstraňování barviv se zabývá velké množství vědeckých skupin. Takové využití biopolymeru v podobě sorbentu se označuje pojmem *biosorpce*.

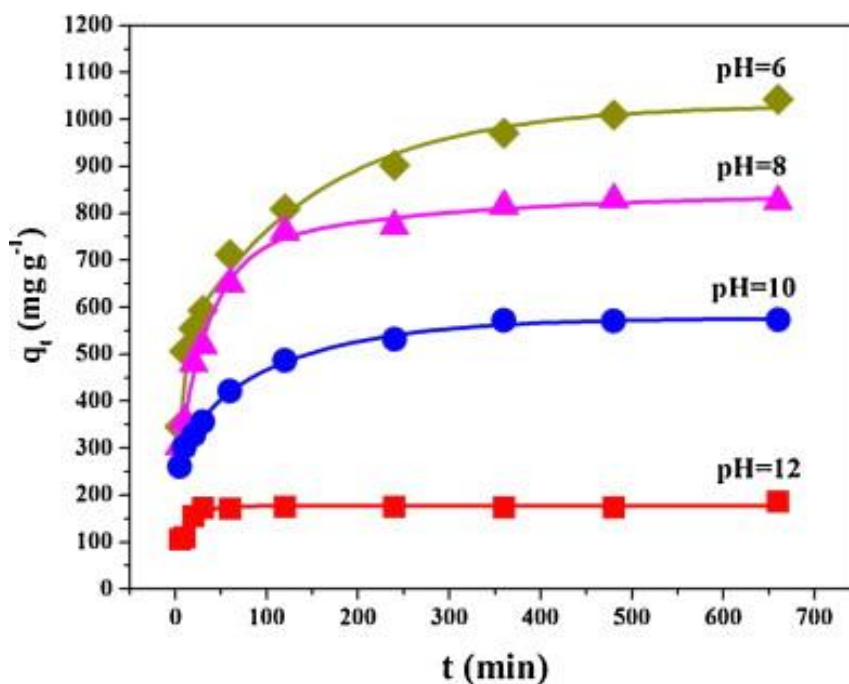
Jedním ze způsobů biosorpce se zabývala i skupina vědců kolem Prof. Zhenga z univerzity v čínském Kantonu [54]. Konkrétně se zaměřili na studium nových materiálů vykazujících významné sorpční schopnosti. Tato oblast studia je v současné době stále více rozvíjena a zdokonalována. Rostoucí množství průmyslových podniků s sebou přirozeně nese i nárůst koncentrace nebezpečných látek v odpadních vodách. Mezi takové látky patří i velké množství barviv, především pak azobarviva. Bohužel výskyt těchto látek v odpadních vodách a posléze podzemních vodách může mít fatální výsledky nejen pro vodní živočichy, ale také pro člověka. Cílem k úspěchu biosorpce je samozřejmě výběr vhodných materiálů. V tomto článku se vědci zabývali kombinací různých materiálů, aby získali efektivní a zároveň co nejuniverzálnější nástroj k odstranění barviv z odpadních vod. Jedním z použitých materiálů byl diatomit neboli křemelina. Jedná se o poměrně jemný práškový materiál obsahující až 90 hm. % oxidu křemičitého. Tento materiál je již dlouhodobě známý adsorbent vzhledem k jeho velkému specifickému povrchu. Kromě něj se zaměřili také na studium chitosanu a především kombinaci modifikovaného chitosanu s diatomitem. Diatomit nemá tak významné sorpční schopnosti a naopak chitosan je zase považován za neselektivní sorbent. Snahou je vytvořit materiál vzniklý jejich kombinací, který by vykazoval požadované vlastnosti.

V poslední době jsou stále oblíbenější deriváty a modifikace chitosanu, v tomto případě chitosan- Fe^{3+} . Kombinace železitých iontů s chitosanem má za následek vyšší měrný povrch a zároveň daleko lepší mechanické a konstrukční vlastnosti. Finální studovaný materiál diatomit/chitosan- Fe^{3+} byl připraven rozpuštěním 1 g chitosanu v 0,2 M roztoku chloridu železitého. Vzniklá směs byla míchána po dobu 4 hodin a následně bylo přidáno 1,5 g křemeliny. Poté byl vzniklý komplex promýván etanolem z důvodu odstranění zbytkového chloridu železitého a následně vysušen. Finální krok této syntézy ještě zahrnoval reakci s 5 hm. % roztokem glutaraldehydu. Po promytí etanolem a vysušení při 80 °C vznikl finální produkt označovaný jako Fe^{3+}/Cs & Dia. Vzniklý materiál byl následně podroben měření na SEM, FT-IR a NMR. Díky tomu bylo možné charakterizovat jak povrch vzniklého materiálu tak i jeho složení a koncentraci jednotlivých složek materiálu.

Nejdůležitějším zkoumaným parametrem však byla sorpční kapacita. Pro její studium bylo vybráno azbarvivo Direct orange 2GL o molekulové hmotnosti $M_r = 739,6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Kromě výše zmíněného materiálu Fe^{3+}/Cs & Dia byly připraveny ještě další vzorky materiálů pro porovnání sorpční kapacity. Konkrétně se jednalo o chitosan/diatomit (Cs/Dia), diatomit, chitosan s železitými ionty (Fe^{3+}/Cs), chitosan. Tyto sorbenty byly umístěny do různě koncentrovaných roztoků barviva 2GL v koncentraci 1 g sorbentu na 1 dm^3 barviva a to při teplotě 25 °C a pH = 6. Na základě těchto měření bylo zjištěno, že připravený materiál Fe^{3+}/Cs & Dia vykazoval jednoznačně největší sorpční kapacitu v porovnání s ostatními sorbenty. Kupříkladu v porovnání se sorpční kapacitou čistého chitosanu vykazoval téměř čtyřnásobnou hodnotu sorpční kapacity, konkrétně 1 235 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ po 12 hodinách v roztoku barviva o koncentraci 1,4 $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Z hlediska souvislosti s předloženou diplomovou prací je podstatně zajímavější druhá část experimentu. V ní se vědci zaměřili na studium vlivu pH na sorpční kapacitu nově nasyntetizovaného sorbentu. Právě sorpce barviva na tento materiál je způsobena převážně elektrostatickou interakcí. Jak již bylo zmíněno v předešlých kapitolách, kationaktivní biopolymer chitosan disponuje velkým množstvím aminoskupin, které tak mohou interagovat s anionaktivními barvivy a vázat je tak pomocí elektrostatických interakcí. V případě barviva 2GL se jedná o sulfonovou skupinu, resp. její sodnou sůl. Vliv pH barviva na sorpční kapacitu u zkoumaného materiálu Fe^{3+}/Cs & Dia je znázorněn na obrázku níže (Obr. 14).

Je zřejmé, že s rostoucí hodnotou pH docházelo k výraznému snižování sorpční kapacity. Aminoskupina chitosanu má $pK_A = 6,5$. S rostoucí hodnotou pH tak bude docházet k tomu, že stále menší počet aminoskupin bude protonizován a výrazně se tak sníží elektrostatické interakce mezi aminoskupinou chitosanu a sulfonovou skupinou barviva. Naopak při kyselějších pH bude docházet k elektrostatické interakci výše zmíněných skupin a vzniku komplexů $-\text{NH}_2^+\text{SO}_3^-$ respektive $=\text{NH}^+\text{SO}_3^-$.



Obr. 14 Vliv pH barviva 2GL na sorpční kapacitu zkoumaného materiálu v závislosti na čase [54]

Výše zmíněný článek poukazuje na velice významnou roli chitosanu jako neselektivního sorbentu v kombinaci s dalšími materiály. Patrný je především vliv pH prostředí na sorpční kapacitu použitého sorbentu. V porovnání s náplní mé diplomové práce se vědci v předloženém článku zabývali studiem materiálu, který je však charakteru pevné látky bez obsahu většího množství vody. Naopak předložená diplomová práce je založena na studiu difúzních procesů v hydrogelové matici tvořené téměř z 99 hm. % vodou. Tomuto modelu více odpovídá materiál, jehož přípravou se zabýval kolektiv autorů kolem Qi Penga [55]. Cílem jejich výzkumu bylo připravit a charakterizovat hydrogelový sorbent ve formě kuliček na bázi chitosanu a minerálu halloyzitu. Právě kombinace těchto dvou materiálů eliminuje mnohé nedostatky každého z nich. Při přípravě sorbentů na bázi chitosanu se lze velmi často setkat s problémem, že vzniklý materiál má nedostatečné mechanické vlastnosti. Ve výsledku pak může docházet k rozpouštění sorbentu či jeho degradaci. Oproti tomu zase aplikace halloyzitu jako adsorbentu při odstraňování barviv je omezená, jelikož při styku s vodou dochází k jeho botnání a tvorbě stabilní koloidní suspenze, jejíž oddělení od zbytku prostředí je poměrně obtížné. Jednotlivé vlastnosti chitosanu i halloyzitu (HNTs) inspirovaly tým vědců z univerzity ve východočínském městě Ťi-nan v provincii Šan-tung ke tvorbě efektivního kompozitního materiálu pro odstraňování barviv z odpadních vod.

Chitosan-HNTs hydrogel byl připraven pomocí tzv. pH-precipitace. Nejprve byl chitosan rozpuštěn v roztoku kyseliny octové za vzniku 2 hm. % roztoku chitosanu, ke kterému byl přidán HNTs ve formě prášku v různých množstvích (0,5 g, 1 g, 2 g, 4 g). Vzniklý roztok byl míchán po dobu 6 hodin a následně přikapáván do roztoku 1 M NaOH za vzniku hydrogelových perel. Tyto perly vykazovaly kromě výborných sorpčních vlastností také dostatečnou mechanickou odolnost, která usnadňuje jejich používání v oblastech biosorpce. Dle očekávání vykazoval největší odolnost vůči poškození materiál obsahující nejvyšší koncentraci HNTs.

Účinnost tohoto sorbentu znázorňuje obrázek níže (Obr. 15). Konkrétně se jedná o roztok methylenové modři o koncentraci $0,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, do kterého byl vložen připravený hydrogelový sorbent v množství $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a v roztoku ponechán dostatečně dlouho. Poté byly hydrogelové kuličky s adsorbovaným barvivem z roztoku vyjmuty.



Obr. 15 *Methylenová modř v roztoku před (a) a po (b) adsorpci chitosan-HNTs a chitosanových kompozitních hydrogelových perel [55].*

Kromě methylenové modře vědci z univerzity ve východočínském městě Ťi-nan použili jako barvivo i malachitovou zeleň, kterou podrobili totožným experimentům. V porovnání s předchozím experimentem jsou zde použita barviva, která vykazují kationaktivní charakter. Tato studie jen potvrzuje významné sorpční schopnosti chitosanu i jako neselektivního sorbentu.

4.2 Modifikace chitosanu

Chitosan je mnohými vědci označován za materiál 21. století. Toto označení ovšem vychází z jeho možných využití. Díky svým unikátním vlastnostem může být využit prakticky napříč průmyslem. Jednou z mála vlastností, které limitují jeho ještě širší využití, je rozpustnost. Ve vodě a většině organických rozpouštědel je prakticky nerozpustný. Roztok chitosanu se tak nejčastěji připravuje jeho rozpuštěním ve slabých organických kyselinách, jako jsou kyselina octová či mravenčí. Proto řada vědeckých skupin upíná svou pozornost na syntézu derivátů chitosanu, které vykazují dobrou rozpustnost i při fyziologickém pH.

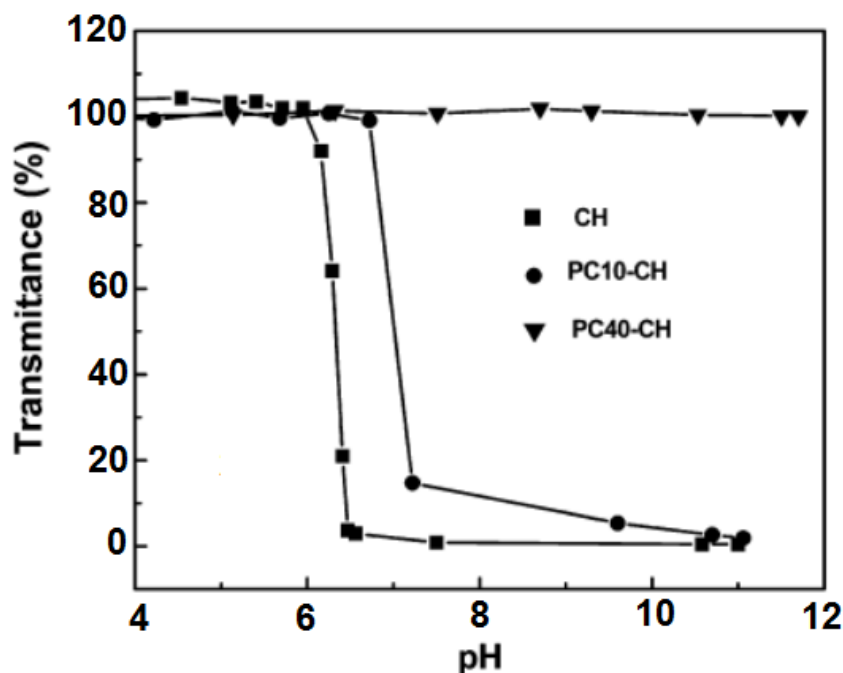
Právě jedním z těchto derivátů se zabýval tým vědců kolem Marcia J. Tiery z univerzity v Montrealu [56]. Cílem jejich práce byla syntéza a charakterizace chitosanu, který je substituovaný fosforylcholinem. Takto substituovaný chitosan pak je rozpustný při hodnotách $\text{pH} = 7,2 - 7,4$. Díky tomu může být snadněji používán ve farmaceutických a biochemických aplikacích. Fosforylcholin (PC) byl zvolen obzvláště díky dobré biokompatibilitě a hemokompatibilitě. Díky tomu mohou vzniklé deriváty tvořit základní stavební jednotku pro cílenou distribuci léčiv, či nosiče pro genovou terapii.

Při syntéze derivátu chitosanu byl nejprve chitosan deacetylován pomocí 50 hm. % roztoku NaOH. Chitosan se stupněm deacetylace 85 % byl nejprve rozpuštěn ve 2 hm. % roztoku kyseliny octové a následně přikapáván do výše zmíněného hydroxidu sodného. Po precipitaci a vysoušení byl celý proces opakován s cílem získat chitosan s vysokým stupněm deacetylace. Při syntéze požadovaného derivátu chitosanu je totiž nezbytné mít jako výchozí látku chitosan s poměrně vysokým stupněm deacetylace. Díky tomu je mnohem reaktivnější a umožňuje snadnější navázání fosforylcholinových skupin. Samotná příprava chitosanu substituovaného PC spočívala v rozpuštění chitosanu ve 2 hm. % kyselině octové. Do tohoto roztoku ochlazeného na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ byl následně po kapkách přidáván roztok fosforylcholinglyceraldehydu v metanolu. Po důkladném promíchání bylo upraveno pH směsi pomocí roztoku NaOH na hodnotu $\text{pH} = 6,5$. Po opětovném ochlazení na teplotu $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ byl přikapáván roztok kyanoborohydridu sodného ve vodě. Vzniklá reakční směs byla zahřáta na laboratorní teplotu a míchána po dobu 20 hodin. Po této době byla směs podrobena dialýze a finální produkt izolován pomocí lyofilizace.

Vzhledem k zamýšlenému použití nově připraveného derivátu, především pro farmaceutické aplikace, bylo nezbytné otestovat materiál z hlediska biokompatibility. Proto byly provedeny in vitro testy cytotoxicity pro deriváty s různým stupněm substituce fosforylcholinu. Z provedených testů vyplývá, že díky přítomnosti polymeru nedochází ke změně viability buněk v porovnání s kontrolní testovanou skupinou.

Rozpustnost nově připraveného biopolymeru byla testována pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Byla pozorována změna transmitance roztoku polymeru chitosan-PC při vlnové délce 566 nm v širokém rozsahu hodnot pH (4 – 11). Transmitance roztoku s rozpuštěným chitosanem, či derivátem chitosan-PC se pohybovala okolo hodnoty 100 %.

Naopak při hodnotě pH, při které je daný polymer nerozpustný, dochází k vysrážení a vzniku zákalu, díky čemuž docházelo ke snižování hodnoty transmitance. Z obrázku níže (Obr. 16) je patrné, že polymer PC40-CH, který je charakteristický stupněm substituce 40 %, vykazuje prakticky konstantní rozpustnost v měřených hodnotách pH (4 – 12).



Obr. 16 Závislost transmitance roztoků vybraných polymerů na hodnotě pH [56].

4.3 Jiné biopolymery plnící funkci sorbentů

Kromě chitosanu lze nalézt celou řadu snadno dostupných a hlavně ekonomicky získatelných materiálů. Jak již bylo zmíněno, za konvenční způsoby biosorpce lze považovat adsorpci látek na aktivním uhlí. Vzhledem k nízké sorpční kapacitě aktivního uhlí je výzkum v této oblasti průmyslu zaměřen na hledání nových materiálů. Jedním z takovýchto materiálů může být lignocelulóza. Pod pojmem lignocelulóza se rozumí směs několika biopolymerů. Z chemického hlediska se tedy nejedná o jednu látku. Právě studiem lignocelulózy a jejím porovnáváním s dalším běžným biosorbentem (chitosanem) se zabýval kolektiv vědců kolem V. S. Trana [57] z Technické univerzity v Sydney. Lignocelulóza tvoří podstatnou část biomasy a je směsí celulózy, hemicelulózy, ligninu, popela, případně dalších látek, jako jsou pektin, proteiny, vitamíny.

Adsorpční kapacita lignocelulózy závisí na mnoha faktorech, zejména na polaritě a aromaticitě jednotlivých materiálů. Právě množství ligninu v lignocelulóze je výhradně zodpovědné za sorpci organických látek. Čím větší množství ligninu v lignocelulóze, tím větší „zadržování“ organických polutantů a jejich snadnější odstranění z vodných roztoků. Hlavním faktorem, proč je lignocelulóza tak dobrý materiál pro biosorpci, je přítomnost funkčních skupin. Jedná se převážně o karboxylové, hydroxylové a silanolové skupiny. Dalším faktorem určující sorpční schopnosti je velikost povrchu. V případě surové lignocelulózy se hodnota velikosti povrchu pohybuje od 3,41 do 25,97 m²·g⁻¹. U čistého chitosanu je tato hodnota pouze 0,65 m²·g⁻¹. Je tedy zřejmé, že rozdíl ve velikosti povrchu a tím pádem i porozity je obrovský.

Naopak modifikované formy lignocelulózy mohou dosahovat hodnot $566 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Oproti tomu perly na bázi chitosanu a alginátu mohou mít velikost povrchu až $102 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

V případě surové lignocelulózy lze zvýšit sorpční kapacitu odstraněním části organické hmoty, jako jsou karbohydráty (celulóza) a naopak je zapotřebí zvýšit porozitu a velikost povrchu, což je nezbytné pro efektivní odstraňování organických polutantů. Působení chemických látek, jako jsou hydroxid sodný, metanol či kyselina chlorovodíková na zvýšení sorpčních vlastností je v případě lignocelulózy prakticky neúčinné. Daleko lepších sorpčních vlastností lze však dosáhnout pomocí tepelného zpracování za nepřístupu vzduchu. Někteří autoři dokonce uvádí, že tepelně ošetřené biosorbenty jsou daleko efektivnější pro eliminaci organických polutantů, než je tomu v případě aktivního uhlí.

Za adsorpci škodlivých látek na biosorbentech je zodpovědná řada mechanismů, které více či méně přispívají k celkové schopnosti odstranit polutanty z vodných roztoků. Mezi tyto mechanismy patří Van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, dipól-dipól interakce, slabé intramolekulární interakce a především elektrostatické interakce. Právě elektrostatické interakce mají velký vliv na sorpci v případě nabitých molekul, resp. jejich funkčních skupin, a v mnoha případech jsou silně závislé na hodnotě pH. Kromě těchto interakcí je však adsorpce silně závislá na mechanismu difúze [57].

Naprostá většina výše zmíněných článků potvrzuje široké uplatnění chitosanu v nejrůznějších aplikacích. Velkou výhodou je především cenová dostupnost chitosanu a tím pádem i nízké náklady na práci s ním spojenou. Proto se řada autorů snaží navrhnout a popsat možné průmyslové využití chitosanu, a to v mnoha odvětvích. Jak popisují předchozí reference [54][55][57], jeví se chitosan jako vhodný sorbent pro řadu použití. Jednou z nich je právě snížení průmyslově produkováných toxických barviv v odpadních vodách. Proto se převážná většina autorů zabývá sorpcemi různých látek s chitosanem a zkoumají, jaký vliv mají měnící se experimentální podmínky (pH, koncentrace, teplota) na sorpci. Charakteristickou veličinou většiny referencí je sorpční kapacita. Experimentální část předložené diplomové práce je založena na studiu interakcí barviv s chitosanem, a to pomocí difúzních procesů. Ačkoliv se mohou zdát tyto dvě témata rozdílná, opak je pravdou. Právě těchto interakcí, jejichž studiem se zabývám v diplomové práci, využívá většina vědců k sorpci polutantů na různých materiálech.

Žádný z výše zmíněných autorů se ve své práci nezabýval samotnými difúzními experimenty, ani stanovení difúzních koeficientů pomocí některých metod popsanych v kapitole 3.6.4.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

hydroxid sodný, Penta Chrudim s.r.o.

hydrogenfosforečnan disodný dihydrát, Penta Chrudim s.r.o.

dihydrogenfosforečnan sodný, Penta Chrudim s.r.o.

kyselina citronová bezvodá, Penta Chrudim s.r.o.

chitosan, medium molecular weight, Sigma Aldrich Co.

kyselina octová 99 %, Lach-ner s.r.o.

agarosa, Sigma Aldrich Co., for routine use

destilovaná voda

barviva:

Chicago sky blue 6B, Sigma Aldrich Co.

Saturnová červeně F3B 200 (Sirius red F3B), Synthesia a.s.

Saturnová zeleň LB (Direct green 26), Synthesia a.s.

Ostazinový tyrkys V-G (Reactive blue 21), Synthesia a.s.

Ostazinová oranž H-2R (Reactive orange 13), Synthesia a.s.

Ostazinová modř H-3R (Reactive blue 49), Synthesia a.s.

5.2 Použité přístroje

UV-VIS spektrofotometr Varian Cary 50

UV-VIS spektrofotometr Hitachi U-3300

topná deska ETA

sušárna Durocell BMT 111 Standard

analytické váhy Sealtex SBC 31

přenosný teploměr GMM 175 Greisinger

přenosný pH metr WTW pH 330

vícemístná míchačka Poly 15

5.3 Příprava vzorků pro testování stability barviv a sorpční experimenty

5.3.1 Příprava roztoků pro testování stability barviv v závislosti na pH

Z velkého množství barviv bylo na základě literární rešerše vybráno 6 zástupců, které by mohly být eventuálně použité pro finální experiment neustálenou difúzi v kyvetách. Cílem předložené diplomové práce je otestovat vliv pH prostředí na difúzi barviv v hydrogelu obsahujícím chitosan. Díky tomu bylo nezbytné otestovat stabilitu použitých barviv ve všech měřených hodnotách pH (pH = 3; 7; 11). Se změnou pH může u některých barviv docházet k posunům absorpčních pásů, což může způsobovat posuny λ_{\max} (vlnová délka dopadajícího záření, která při interakci s konkrétní látkou vykazuje nejvyšší hodnotu absorbance). Roztoky barviv byly připraveny na základě tabulky níže (Tab. 5). Vhodná koncentrace jednotlivých barviv byla určena na základě provedených měření pomocí UV-VIS spektrofotometru Varian Cary 50. Tato koncentrace byla volena tak, aby roztok vykazoval absorbanci okolo hodnoty 1. Za této podmínky je možné použít Lambert-Beerův zákon pro určení koncentrace barviv na základě kalibračních křivek.

Tab. 5 Testovaná barviva a jejich koncentrace

barvivo	koncentrace [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]
Chicago sky blue 6B (Direct blue 1)	0,01
Saturnová červen F3B 200 (Sirius red F3B)	0,04
Saturnová zeleň LB (Direct green 26)	0,06
Ostazinový tyrkys V-G (Reactive blue 21)	0,03
Ostazinová oranž H-2R (Reactive orange 13)	0,05
Ostazinová modř H-3R (Reactive blue 49)	0,10

Pro studium stability barviv byla výše zmíněná barviva připravena v roztocích fosfátových pufrů o hodnotách $\text{pH} = 3$, $\text{pH} = 7$ a $\text{pH} = 11$. Každé z těchto barviv bylo odváženo na analytických vahách (dle koncentrací v tabulce výše, viz Tab. 5), rozpuštěno v 1 dm^3 destilované vody a ponecháno na magnetické míchačce při rychlosti otáčení 250 RPM po dobu 4 hodin. Po úplném rozpuštění bylo každé barvivo přelito do 4 reagenčních lahví o objemu 250 ml. Tři z těchto lahví byly označeny postupně dle pH : $\text{pH} = 3$, $\text{pH} = 7$, $\text{pH} = 11$ a následně do nich byly odváženy chemikálie v množství dle tabulky níže. Čtvrtá láhev byla ponechána jako zásobní roztok barviva v destilované vodě bez dalšího přídavku chemikálií.

Tab. 6 Navážky pro přípravu pufrů o různém pH

označení lahve	navážka [g]	chemikálie
$\text{pH} = 3$	0,445	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$
	2,402	kyselina citronová
$\text{pH} = 7$	0,445	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$
	0,390	NaH_2PO_4
$\text{pH} = 11$	0,445	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$
	0,100	NaOH

Pro úplné rozpuštění navážek byly roztoky barviv ponechány do druhého dne na magnetické míchačce při 250 RPM.

5.3.2 Příprava roztoku biopolymeru

Pro sorpční i difúzní experimenty byl připraven roztok chitosanu o koncentraci $0,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, který byl připraven následujícím způsobem. Na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa bylo naváženo 0,01 g chitosanu. Navážka chitosanu byla rozpuštěna v 50 ml 5 hm. % kyselině octové a ponechána na magnetické míchačce při rychlosti 250 RPM

po dobu 24 hodin. Následně bylo pH vzniklého roztoku upraveno přikapáváním 2M hydroxidu sodného na $\text{pH} = 7$. Po úpravě pH byl roztok přelit do odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou na celkový objem 100 ml. Pro jednotlivé experimenty byl vždy připraven čerstvý roztok chitosanu, aby nedocházelo k ovlivňování interakcí chitosanu s barvivem vlivem stárnutí roztoku biopolymeru.

5.3.3 Příprava hydrogelových vzorků pro sorpční experimenty

Sorpční experimenty, stejně jako následné difúzní experimenty, byly realizovány v hydrogelových maticích na bázi termoreverzibilní agarózy. Mezi zjevné výhody použití agarózy (viz kapitola 3.4) patří z hlediska sorpčních i difúzních experimentů hlavně její prakticky inertní charakter k interakcím s iontovými sloučeninami.

Hydrogelové vzorky pro sorpční experiment byly připraveny následujícím způsobem. Na předvážkách vážících s přesností na 3 desetinná místa bylo odváženo 0,1 g agarózy a přidáno do dvou kádinek obsahujících:

- pro hydrogel bez přídavku chitosanu obsahovala kádinka pouze 10 ml destilované vody
- pro hydrogel s chitosanem o koncentraci 0,001 hm. % obsahovala kádinka 1 ml roztoku chitosanu a 9 ml destilované vody

Takto připravené roztoky byly zahřívány na topné desce na teplotu 85 °C, při které dochází k rozpuštění agarózy. Po dosažení této teploty byly ještě horké roztoky nality do skleněných trubiček o vnitřním průměru 1 cm a délce taktéž 1 cm. Tyto trubičky byly ještě před naplněním utěsněné z jedné strany parafilmem, aby nedocházelo k vytékání hydrogelu ze spodní strany. Po naplnění roztokem byly trubičky ponechány zatuhnout po dobu 45 minut. Poté byla přebytečná část hydrogelu nad trubičkou seříznuta skalpelem, aby vzniklo ostré rozhraní. Díky tomu byl zajištěn jednotný objem a tvar hydrogelu použitelný pro sorpční experimenty u všech testovaných barviv.

5.3.4 Příprava sorpčních experimentů

Sorpční experimenty byly realizovány pro všechna barviva, která jsou popsána v tabulce výše (Tab. 5) s výjimkou barviva Direct green 26. Jak je uvedeno a v kapitole 6.1 toto barvivo bylo v různých pH nestabilní a s časem docházelo ke změně absorpčního spektra, což se projevovalo snižováním hodnoty absorbance při λ_{max} a zároveň posuny absorpčního pásu. To je ostatně znázorněno na obrázku níže (Obr. 17). Proto toto barvivo nebylo vybráno pro další studium.

Při samotném experimentu bylo do dvou plastových nádobek napipetováno 20 ml barviva o $\text{pH} = 7$. Do jedné z nádobek byla vložena skleněná trubička (jejíž příprava je popsána v kapitole výše) s hydrogelem bez přídavku chitosanu a do druhé nádoby trubička s hydrogelem obsahující chitosan o koncentraci 0,001 hm. %. Před umístěním skleněných trubiček do nádoby byl z každé odstraněn parafilm. Díky tomu byl hydrogel v trubičce v kontaktu s roztokem ze dvou stran. Po uplynutí 6 dnů byla pomocí UV-VIS spektrofotometru Hitachi U-3300 změřena absorbance roztoků z obou nádobek a porovnána s původní hodnotou absorbance. Tímto způsobem bylo realizováno měření sorpčních experimentů pro každé z vybraných barviv (celkově 5 barviv).

5.4 Příprava vzorků pro difúzní experimenty

5.4.1 Příprava hydrogelových vzorků s přidavkem biopolymeru

Pro studium vlivu pH na transportní vlastnosti barviv pomocí difúze v kyvetách, byly připraveny dva typy hydrogelových vzorků, obdobně jako v kapitole výše. Jeden vzorek představoval čistý agarózový hydrogel bez jakéhokoliv přidavku chitosanu a druhý typ byl tvořen agarózovým hydrogelem obsahujícím 0,001 hm. % chitosanu. Koncentrace agarózy v obou typech vzorků byla stejná, a to 1 hm. %.

Po zahřátí roztoků, jejichž příprava byla popsána v předešlé kapitole (kap. 5.3.3), na teplotu 85 °C byly ještě horké roztoky nality do plastových kyvet a ponechány zatuhnout po dobu 45 minut. Poté byla přebytečná část hydrogelu nad kyvetou seříznuta skalpelem, aby vzniklo ostré rozhraní.

Pro určení koncentrace barviva v hydrogelu během difúzních experimentů bylo nezbytné sestavit koncentrační řadu každého z barviv v hydrogelových kyvetách. Tyto koncentrační závislosti musely být připraveny zvlášť pro každou hodnotu pH a pro oba typy hydrogelových vzorků (jak s obsahem chitosanu, tak i pro hydrogel bez chitosanu). Díky těmto koncentračním závislostem bylo možné přepočítat hodnotu absorbance (změřenou pomocí UV-VIS spektrofotometru) na koncentraci. Na základě výsledků sorpčních experimentů popsaných v kapitole 6.2, byla pro difúzní experimenty vybrána 3 barviva, pro které bylo nezbytné připravit výše zmíněnou koncentrační závislost. Příklad takové koncentrační řady je uveden v tabulce níže (Tab. 7 a Tab. 8). Jedná se o koncentrační řadu kyvet pro barvivo Chicago sky blue 6B o pH = 3.

Tab. 7 Postup pro přípravu roztoků kalibrační řady barviva Chicago sky blue 6B o pH = 3 pro hydrogel s chitosanem o koncentraci 0,001 hm. %.

roztok barviva o pH = 3 [ml]	pufr o pH = 3 [ml]	roztok chitosanu [ml]	koncentrace barviva [g·dm ⁻³]
0	9	1	0,000
1	8	1	0,001
3	6	1	0,003
5	4	1	0,005
9	0	1	0,009

Tab. 8 Postup pro přípravu roztoků kalibrační řady barviva Chicago sky blue 6B o pH = 3 pro hydrogel bez přídavku chitosanu.

roztok barviva o pH = 3 [ml]	pufir o pH = 3 [ml]	roztok chitosanu [ml]	koncentrace barviva [g·dm ⁻³]
0	10	–	0,000
1	9	–	0,001
3	7	–	0,003
5	5	–	0,005
10	0	–	0,010

Do každého z roztoků v tabulkách výše bylo přidáno 0,1 g agarózy a roztoky byly zahřívány na teplotu 85 °C. Poté byly nality do kyvet a ponechány zatuhnout po dobu 45 minut. Tímto způsobem tedy bylo připraveno 10 kyvet, pro jedno barvivo a jednu hodnotu pH. Vzhledem ke studovaným hodnotám pH (pH = 3; 7; 11) bylo celkově pro každé barvivo připraveno 30 hydrogelových kyvet pro určení kalibrační přímky. Pro kalibrační závislosti všech tří studovaných barviv bylo tedy celkem připraveno 90 kyvet s agarózovým hydrogelem a různou koncentrací barviva i chitosanu.

Na základě výsledků z difúzních experimentů všech tří barviv byly ještě realizovány difúzní experimenty v barvivu Chicago sky blue 6B o pH = 3 s různou koncentrací chitosanu v hydrogelu. Cílem tohoto měření bylo zjistit, jaký je vliv koncentrace chitosanu uvnitř agarózového gelu na mobilitu použitého barviva. Kyvety s agarózovým gelem s různou koncentrací chitosanu byly připraveny následujícím způsobem. Ze zásobního roztoku chitosanu o koncentraci 0,1 g·dm⁻³ (viz kapitola 5.3.2) bylo do kádinek odpipetováno:

- pro koncentraci chitosanu v gelu 0,0000 hm. % nebyl přidán žádný chitosan
- pro koncentraci chitosanu v gelu 0,0002 hm. % bylo přidáno 0,2 ml roztoku chitosanu
- pro koncentraci chitosanu v gelu 0,0005 hm. % bylo přidáno 0,5 ml roztoku chitosanu
- pro koncentraci chitosanu v gelu 0,0010 hm. % bylo přidáno 1,0 ml roztoku chitosanu

Následně bylo do každé z kádinek přidáno 0,100 g agarózy a pufrem o pH = 3 bylo toto množství v kádinkách doplněno na celkový objem 10 ml. Poté byly roztoky zahřívány na teplotu 85 °C a dále se pokračovalo způsobem uvedeným v kapitole 5.3.3.

Aby bylo možné tyto kyvety s různou koncentrací chitosanu po realizaci difúzních experimentů vyhodnotit, bylo zapotřebí ještě připravit kalibrační křivku pro hydrogel s obsahem chitosanu o koncentraci 0,0002 hm. % a 0,0005 hm. %. Tato koncentrační závislost byla připravena postupem uvedeným výše (Tab. 7), avšak s tím rozdílem, že množství roztoku chitosanu přidaného do každé kádinky místo 1,0 ml bylo 0,2 ml (pro hydrogel o koncentraci chitosanu 0,0002 hm. %) a 0,5 ml (pro hydrogel o koncentraci chitosanu 0,0005 hm. %). Chybějící objem v kádince byl doplněn pufrem o pH = 3 na celkový objem 10 ml.

5.4.2 Příprava difúzních experimentů

Kyvety s hydrogelem, připravené výše uvedeným způsobem, byly ponořeny do difúzní nádoby, obsahující 250 ml roztoku barviva o některém ze studovaných pH, vytemperovaného na laboratorní teplotu. Do každé difúzní nádoby byly umístěny dvě kyvety s hydrogelem (jedna bez přídavku chitosanu a druhá obsahující 0,001 hm. % chitosanu), doprostřed difúzní nádoby bylo umístěno magnetické míchadlo a celá nádoba byla umístěna na magnetickou míchačku. V případě studia vlivu koncentrace chitosanu na difúzi v barvivo Chicago sky blue 6B byly do difúzní nádoby o pH = 3 umístěny 4 kyvety s různou koncentrací chitosanu. Rychlost míchání byla nastavena na hodnotu 250 RPM. Aby nedocházelo ke změně koncentrace barviva z důvodu odpařování roztoku, byla nádoba opatřena víkem a utěsněna parafilmem. Tímto způsobem byl připraven difúzní experiment pro každé ze tří studovaných barviv a pro každou hodnotu pH barviva. Celkově tedy pro každé barvivo byly připraveny 3 nádoby o různém pH, obsahující kyvety s hydrogelem a pro barvivo Chicago sky blue 6B ještě navíc jedna nádoba obsahující 4 hydrogelové kyvety s různou koncentrací chitosanu o pH = 3.

Kyvety byly v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin proměřovány pomocí UV-VIS spektrofotometru Varian Cary-50 v oblasti vlnových délek charakteristických pro konkrétní barvivo. Toto rozmezí vlnových délek bylo voleno individuálně pro každé barvivo s ohledem na λ_{\max} a celkový tvar absorpčního spektra. Díky polohovatelnému nástavci bylo možné kyvety proměřit od 3 mm od rozhraní hydrogel-roztok až po 38 mm od tohoto rozhraní. Případně po místo, kde již nebyla patrná přítomnost barviva. Tímto způsobem byla získána spektra v celé délce hydrogelu, kde byl měřitelný výskyt použitého barviva. V jednotlivých polohách kyvety byla absorbance pomocí kalibrační křivky přepočítána na koncentraci a poté vynesena do grafu.

Veškeré vzorky byly připravené dvakrát a stejně tak sorpční i difúzní experimenty byly realizovány a měřeny dvakrát, aby se eliminovaly chyby vzniklé při přípravě či měření jednotlivých experimentů.

6 DISKUZE A VÝSLEDKY

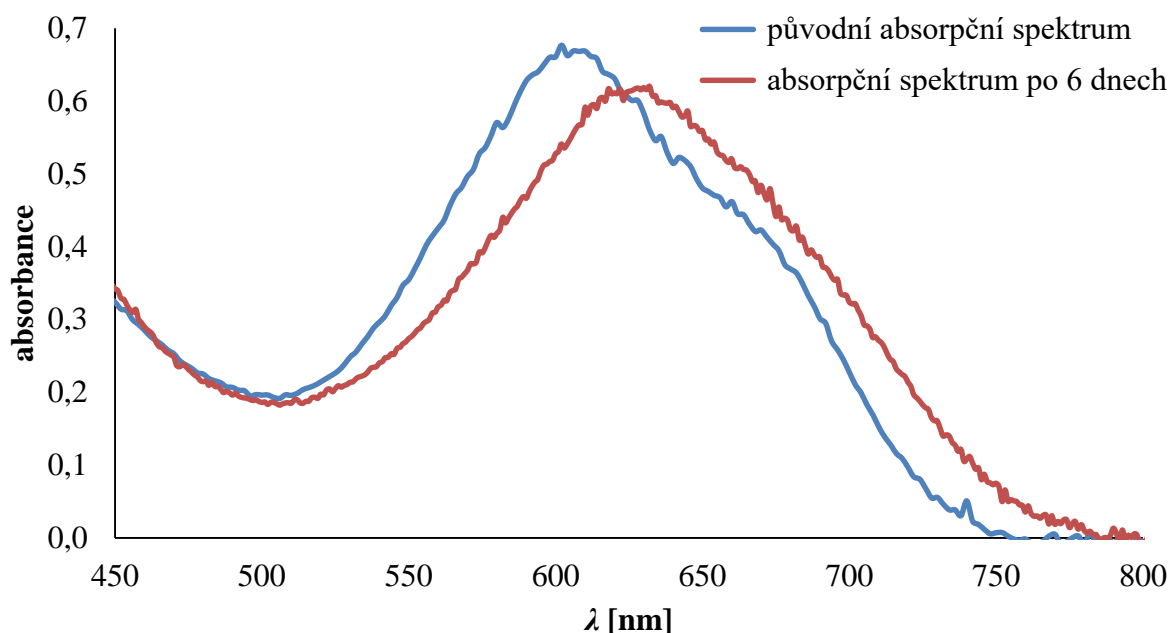
6.1 Studium stability barviv v závislosti na pH

U organických barviv může často se změnou pH docházet k posunům absorpčních pásů, které jsou pro každé barvivo typické. Jedná se především o změnu chromoforů vlivem pH, což jsou skupiny, zodpovědné za absorpci záření. Díky tomu pak může docházet k posunům λ_{\max} , případně ke změně hodnoty absorbance s rostoucím časem (roztok barviva mění své typické zbarvení či jeho intenzitu). Pokud by v průběhu difúzních experimentů, které tvoří hlavní náplň předložené diplomové práce, docházelo k těmto změnám barviva, nebylo by pak možné zajistit správnost výsledků na základě stanovených kalibračních křivek. Koncentrace barviva v hydrogelu by pak neodpovídala skutečnosti a na základě toho by byla nesprávně určena hodnota efektivního difúzního koeficientu, jakožto hlavního studovaného parametru.

Při samotném experimentu bylo 20 ml každého z barviv, připravených v pufrech o různých pH (viz kapitola 5.3.1), odpipetováno do plastových uzavíratelných nádobek a po 6 dnech byla pomocí UV-VIS spektrofotometru Varian Cary 50 změřena absorbance těchto barviv v rozmezí vlnových délek 300 – 900 nm. Naměřená absorpční spektra byla porovnána se spektry

původních roztoků barviv, která byla získána před zahájením sorpčních experimentů. Časový horizont těchto měření byl tedy 6 dnů.

S výjimkou barviva Direct green 26 vykazovala ostatní barviva poměrně dobrou stabilitu v určitých hodnotách pH po 6 dnech. Právě v případě barviva Direct green 26 docházelo při $\text{pH} = 3$ k posunům absorpčního pásu k vyšším vlnovým délkám (posun přibližně 30 nm). Absorpční spektrum barviva v rozmezí 6 dnů znázorněno na obrázku níže (Obr. 17). Díky této změně absorpčního spektra s časem by pak nebylo možné použít předem naměřenou kalibrační přímku pro stanovení koncentrace barviva ve finálním difúzním experimentu. Proto barvivo Direct green 26 bylo z výběru barviv vyřazeno a nebyly s ním realizovány ani navazující experimenty, zejména sorpce barviva. U ostatních barviv nedocházelo k žádným velkým změnám v absorpčních spektrech a tak mohly být použity pro další experimenty.



Obr. 17 Rozdíl v absorpčních spektrech barviva Direct green 26 v rozmezí 6 dnů.

6.2 Studium interakce chitosanu s barvivy pomocí sorpčních experimentů

Tento experiment byl realizován za účelem zjištění míry interakce chitosanu s výše zmíněnými barvivy. Vzhledem k tomu, že chitosan disponuje přítomností aminoskupiny, je schopen interakce s anionaktivními barvivy, která byla použita v tomto experimentu. Tato interakce je elektrostatického charakteru a je silně závislá na hodnotě pH. Pro tento experiment byly použity roztoky barviv o neutrální hodnotě pH ($\text{pH} = 7$). Aminoskupina chitosanu je charakteristická hodnotou $\text{pK}_\text{A} = 6,5$. Z toho vyplývá, že při neutrální hodnotě pH bude přibližně stejný počet kladně nabitých i nenabitých aminoskupin, případně malý nadbytek nenabitých aminoskupin. I přesto zde bude mnoho protonizovaných aminoskupin, které tak mají prostor interagovat s opačně nabitými skupinami použitých barviv, zejména sulfonovými skupinami. Těmito sorpčními vlastnostmi chitosanu se zabývá velké množství prací, což je ostatně popsáno v kapitole popisující současný stav problematiky. Popis přípravy hydrogelových vzorků a samotného experimentu je popsán v kapitole 5.3.3.

Jak vyplývá z výsledků měření, u všech barviv docházelo do jisté míry k úbytku koncentrace barviva v roztoku. Z těchto výsledků je také zřejmé, že největší úbytek koncentrace barviv byl

pozorován v roztocích obsahujících hydrogelové vzorky s přidavkem chitosanu. Výsledky sorpčních experimentů znázorněny v tabulkách níže (Tab. 9 a Tab. 10).

Tab. 9 *Výsledky sorpčních experimentů pro "slepé" vzorky tvořené pouze 1 hm. % agarózou bez přidavku chitosanu.*

barvivo	absorbance původního roztoku	absorbance roztoku po sorpci (6 dnech)	rozdíl	rozdíl [%]
Reactive blue 21	1,178	1,111	0,067	5,73
Chicago sky blue 6B	1,657	1,643	0,015	0,88
Sirius red F3B	1,052	1,040	0,012	1,14
Reactive blue 49	0,890	0,860	0,030	3,37
Reactive orange 13	1,252	1,216	0,037	2,92

Tab. 10 *Výsledky sorpčních experimentů pro hydrogelové vzorky tvořené 1 hm. % agarózou a 0,001 hm. % chitosanem.*

barvivo	absorbance původního roztoku	absorbance roztoku po sorpci (6 dnech)	rozdíl	rozdíl [%]
Reactive blue 21	1,178	0,844	0,334	28,35
Chicago sky blue 6B	1,657	1,255	0,402	24,26
Sirius red F3B	1,052	0,826	0,227	21,53
Reactive blue 49	0,890	0,777	0,113	12,70
Reactive orange 13	1,252	1,110	0,142	11,34

Cílem těchto měření tedy bylo zjistit, jaké jsou rozdíly v koncentracích barviv před a po aplikaci hydrogelových vzorků ve formě skleněných trubiček. Tento úbytek koncentrace barviva by mohl být eventuálně dán interakcí chitosanu s modelovými barvivami. Tento předpoklad byl následně studován a potvrzen pomocí difúzních experimentů. U barviv, u nichž docházelo k nejvyšším rozdílům v koncentracích před a po aplikaci hydrogelových trubiček se tak dala předpokládat vyšší šance na interakci s chitosanem. Tento experiment tedy sloužil k výběru těch barviv, u nichž docházelo k největším poklesům v koncentracích a tudíž je u těchto barviv vyšší pravděpodobnost interakce s chitosanem. Příklad hydrogelové trubičky po 6 dnech v barvivu Sirius red F3B o pH = 3 znázorněn na obrázku níže (Obr. 18).



Obr. 18 Skleněná trubička obsahující hydrogel s chitosanem (0,001 hm. %) po 6 dnech v barvivu Sirius red F3B o $pH = 3$.

Vzhledem k tomu, že difúzní experimenty jsou, co se týče měření i vyhodnocení, významně časově náročné, bylo zapotřebí zúžit množství barviv použitých pro finální difúzní experiment ideálně na 3 barviva. Jak vyplývá z tabulky výše, nejvyšší úbytek v koncentraci po sorpci hydrogelem s přídavkem chitosanu vykazovalo barvivo Reactive blue 21. Dá se tedy předpokládat, že při použití tohoto barviva pro difúzní experimenty by docházelo k nejvýraznější interakci chitosanu s tímto barvivem a tím pádem ke zpomalování procesu difúze. I přes tento předpoklad nebylo toto barvivo vybráno pro další experiment, jelikož absorpční spektrum barviva bylo tvořeno dvěma poměrně širokými pásy, což by mohlo způsobovat problémy při následném vyhodnocování difúzních experimentů. Pro finální difúzní experiment byla tedy vybrána barviva dle pořadí v tabulce výše (Tab. 10) s výjimkou výše zmíněného Reactive blue 21. Konkrétně se jednalo o barviva:

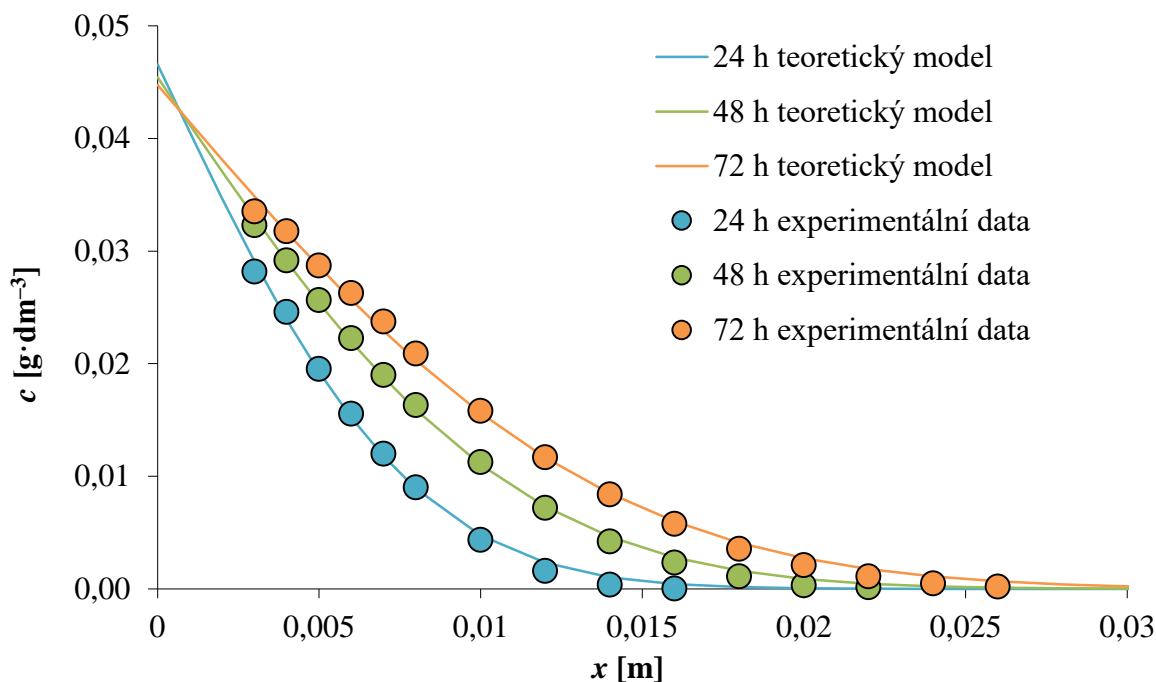
Tab. 11 Barviva vybraná pro difúzní experimenty

barvivo	koncentrace [g·dm]	λ_{\max} [nm]
Chicago sky blue 6B	0,01	621
Sirius red F3B	0,04	540
Reactive blue 49	0,10	604

6.3 Neustálená difúze v kyvetách

Jedná se o jeden z experimentálních způsobů určení difúzního koeficientu. Celý experiment byl založen na metodě tzv. konstantního zdroje, popsáném v jedné z předchozích kapitol (3.6.4.2). Základním předpokladem pro realizaci tohoto experimentu dle metody konstantního zdroje je dostatečně velký objem zdrojového roztoku, aby vlivem difúzních procesů nedocházelo ke změnám v koncentraci zdrojového roztoku. Difúzní koeficienty byly v předloženém experimentu získány z naměřených dat pomocí proložení experimentálně stanoveného koncentračního profilu s teoretickým modelem funkce (viz Obr. 19), který vznikl matematickou úpravou Fickových zákonů (rovnice 14). Experimentální data získaná měřením

pomocí UV-VIS spektrofotometru Varian Cary-50 byla dále zpracovávána programem Origin a MS Excel.



Obr. 19 Experimentálně zjištěný koncentrační profil barviva Sirius red F3B o $pH = 7$ v hydrogelu bez chitosanu proložený teoretickým modelem.

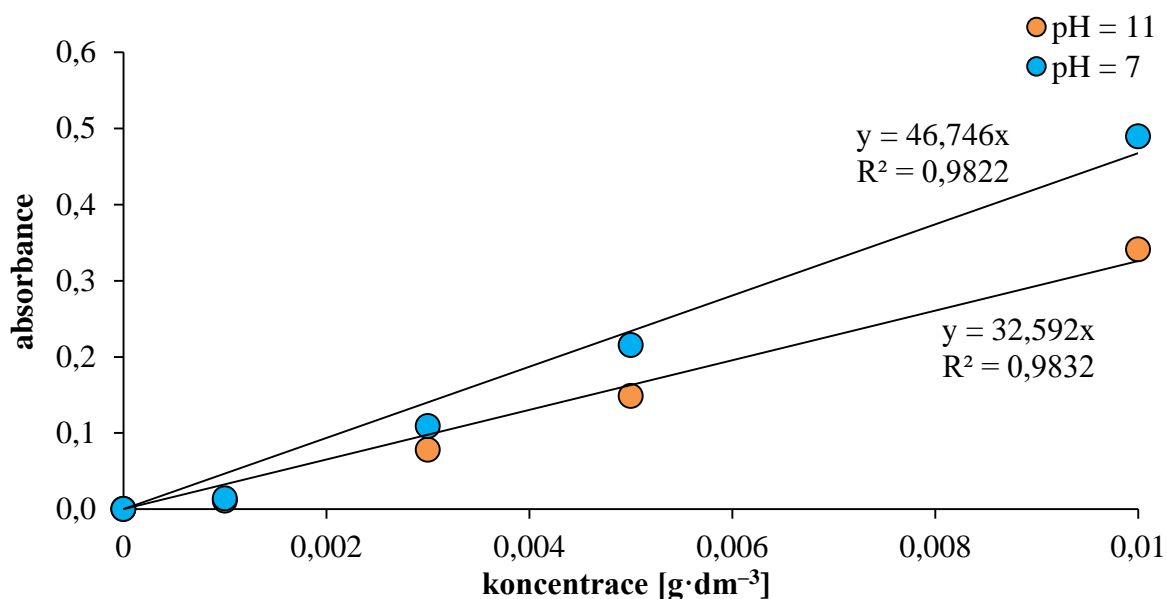
Cílem předloženého experimentu bylo zjistit, jaký vliv má změna pH prostředí na transportní vlastnosti modelových barviv v hydrogelové matici na bázi termoreverzibilní agarózy s přídavkem chitosanu. Jak již bylo několikrát zmíněno, chitosan disponuje přítomností aminoskupiny, která je schopná interagovat se sulfonovými skupinami použitých barviv. Právě tato interakce je silně závislá na hodnotě pH, což tvořilo základ pro realizaci tohoto experimentu. V něm byly difúzní experimenty realizovány při třech hodnotách pH, a to konkrétně $pH = 3$, $pH = 7$ a $pH = 11$. Tyto hodnoty pH byly voleny záměrně vzhledem k disociační konstantě chitosanu, která má hodnotu $pK_A = 6,5$.

Podstatou difúzních experimentů bylo monitorování časové závislosti difúzních dějů v hydrogelové matici prostřednictvím UV-VIS spektrofotometrie, a to využitím modelových sond ve formě barviv. Naměřené hodnoty absorbance jednotlivých barviv byly přepočítány na koncentraci pomocí předem určených kalibračních křivek. Ty byly sestrojeny pro koncentrační řadu barviva a oba typy hydrogelových vzorků (jeden bez chitosanu, druhý s chitosanem o koncentraci 0,001 hm. %). Pro barvivo Chicago sky blue 6B byly navíc ještě sestrojeny koncentrační řady pro hydrogely s obsahem chitosanu 0,002 hm. % a 0,0005 hm. %. Jak vyplývá ze směrnice kalibračních křivek znázorněných v tabulce níže (Tab. 12), rozdíly v koncentračních řadách barviva pro hydrogel s obsahem chitosanu a hydrogel bez chitosanu nejsou pro $pH = 7$ příliš výrazné. Avšak obecný trend ukazuje, že zvýšená koncentrace chitosanu má mírný vliv na hodnotu absorbance při stejné koncentraci barviva. Lze usuzovat, že dochází k interakci aminoskupin chitosanu a sulfonových skupin barviv za následného snížení hodnoty absorbance při měřené vlnové délce.

Tab. 12 *Směrnice kalibračních křivek barviv pro pH = 7*

barvivo	koncentrace chitosanu v hydrogelu [hm. %]	směrnice kalibrační přímky [dm³·g⁻¹]
Chicago sky blue 6B	0,000	46,75
	0,001	43,10
Sirius red F3B	0,000	24,32
	0,001	23,74
Reactive blue 49	0,000	6,04
	0,001	5,50

Barviva byla na základě experimentu popsáném v kapitole 6.1, označena jako stabilní. To ovšem neznamená, že při různých hodnotách pH mají tato barviva totožná absorpční spektra. Důležité však je, aby tato absorpční spektra byla stálá v čase a nedocházelo k jejím posunům, jak tomu bylo např. u barviva Direct green 26. Všechny ze tří použitých barviv měly prakticky shodné hodnoty λ_{\max} při všech změřených hodnotách pH. Díky tomu bylo možné při vyhodnocování použít vlnové délky popsané v tabulce výše (Tab. 11). Odlišně tomu bylo v případě intenzity zbarvení, tudíž změřené absorbance. Konkrétně barvivo Chicago sky blue 6B vykazovalo při totožné koncentraci za různých pH odlišnou hodnotu absorbance. Jak znázorňuje obrázek níže (Obr. 20), při pH = 11 docházelo k poklesu absorbance pro celou koncentrační řadu barviva. To mělo samozřejmě za následek pokles směrnice, patrný z grafu níže. Obdobný trend vykazovala i koncentrační závislost tohoto barviva při stejných pH avšak s přidavkem chitosanu. Odlišná intenzita zbarvení u tohoto barviva při různých pH byla patrná i vizuálně. Rozdíl v absorbanci zmíněného barviva o stejné koncentraci byl při pH = 3 a pH = 7 minimální v porovnání s pH = 11.



Obr. 20 Kalibrační křivka barviva Chicago sky blue 6B pro pH = 7 a pH = 11 bez chitosanu.

Experimentálně získaná data byla proložena teoretickým modelem funkce získané matematickou úpravou Fickových zákonů (rovnice 14). Tento teoretický model byl určen pomocí metody nejmenších čtverců přídavné funkce Řešitel v programu MS Excel. Kromě difúzního koeficientu byla zjišťována také koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok.

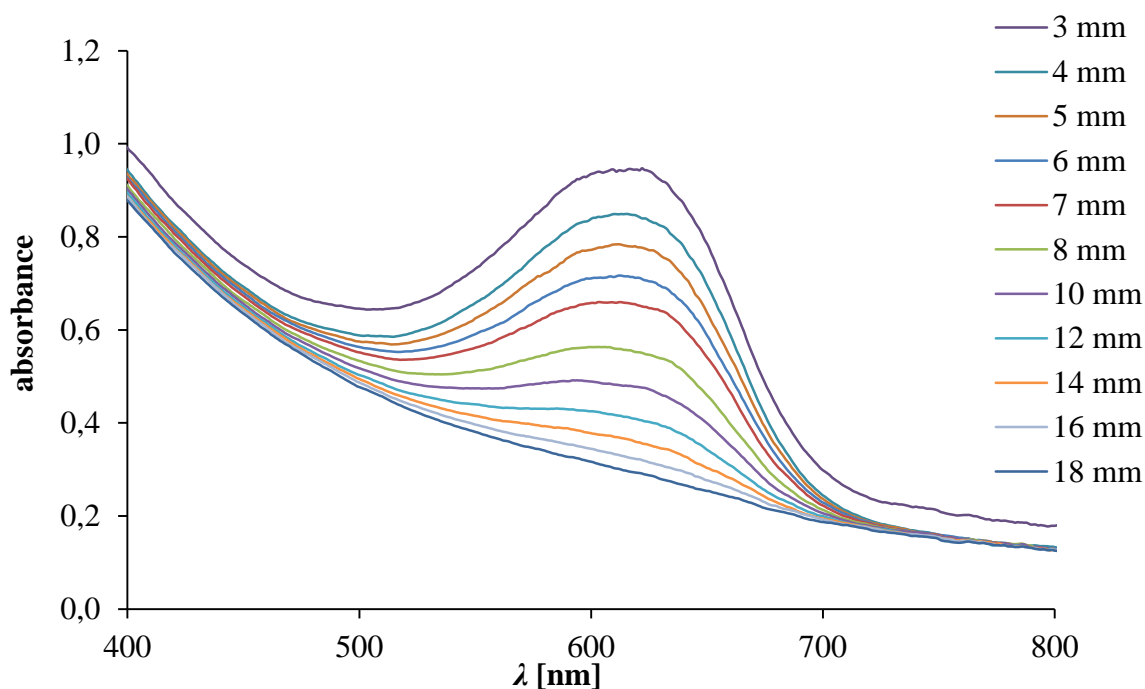
Měření kalibračních křivek probíhalo pomocí UV-VIS spektrofotometru Varian Cary 50 v oblasti vlnových délek, které jsou pro tato barviva charakteristická (u všech barviv byla zahrnuta měřená oblast 400 – 700 nm). Kyvety byly pomocí vertikálně polohovatelného nástavce proměřeny ve vzdálenosti 1,5 cm od rozhraní hydrogel-roztok. Každé z naměřených absorpčních spekter bylo dále upravováno programem Origin 8. Zde byla experimentálně získaná spektra pomocí předdefinované funkce vyhlazena, aby nedocházelo k chybám vzniklých špatnou interpretací dat. Porovnání vyhlazeného a nevyhlazeného spektra v příloze níže (Příloha 1 a Příloha 2).

K dalším úpravám v programu Origin 8 patřila funkce *baseline correction*. Díky použití této funkce bylo možné eliminovat vliv samotné agarózy na absorpční spektrum. Jak již bylo zmíněno výše, důležitá je také volba rozsahu vlnových délek pro každé z barviv. Upravená data byla následně zkopírována do programu MS Excel, kde byla dále vyhodnocována. Výsledkem těchto vyhodnocení v případě měření kalibrační závislosti byl získání hodnoty absorbance pro každou koncentraci barviva dle tabulek výše (Tab. 7 a Tab. 8) pro vlnové délky charakteristické pro použité barviva (Tab. 11). Tato data byla vynesena do grafu a následně proložena lineární regresí.

Cílem měření bylo stanovit efektivní difúzní koeficient a koncentraci barviva na rozhraní pro různé hodnoty pH studovaných barviv. Tato měření probíhala při laboratorní teplotě, jelikož vliv teploty na proces difúze byl již studován v bakalářské práci. Kyvety byly připraveny dle postupu v kapitole 5.3.3 a měřeny po časech 24, 48 a 72 h. Každá z kyvet byla při měření umístěna do vertikálního nástavce a poloha měření byla nastavena na 3 mm od rozhraní hydrogel-roztok. Tato vzdálenost byla volena především kvůli podmínkám a opakovatelnosti měření. V menší vzdálenosti od rozhraní by také docházelo k podstatně výraznějšímu nárůstu

absorbance vlivem sorpce barviva při nízkém pH. Aplikovatelnost Lambert-Beerova zákona by pak nebyla úplně korektní. Od polohy 3 mm až po 8 mm od rozhraní hydrogel-roztok byla absorpční spektra měřena vždy po 1 mm. Od hodnoty 8 mm od rozhraní již byla spektra měřena po 2 mm, a to až do místa, kde nebyl měřitelný výskyt žádného z barviv. Takovým způsobem byly proměřeny všechny vzorky ve 24 hodinových intervalech (Obr. 21). Vyhodnocování spekter se provádělo v Originu a MS Excel a bylo prakticky totožné s vyhodnocováním kyvet pro určení kalibrační křivky.

Příklad z měření jedné hydrogelové kyvety je znázorněn na obrázku níže (Obr. 21). Konkrétně se jedná o vzorek hydrogelu bez obsahu chitosanu v barvivu Chicago sky blue 6B o $\text{pH} = 3$, měřený po 72 hodinách v tomto barvivu. Jednotlivá spektra znázorněná níže jsou již vyhlazená pomocí předdefinované funkce (*smooth all curves*) v programu Origin 8. Zároveň je z grafu níže patrný nárůst absorbance a následný posun celého spektra měřeného ve vzdálenosti 3 mm od rozhraní hydrogel-roztok. Právě tento efekt je způsoben přítomností agarózy a použitým barvivem. Proto při následném vyhodnocení musela být vyhodnocována každá křivka zvlášť pomocí funkce *baseline correction* popsané v postupu výše. Díky této funkci bylo možné nastavit základní měřenou hladinu a vyhodnocovat tak pouze pík způsobený absorbcí barviva, jehož hodnota je maximální při vlnové délce λ_{max} (Příloha 3).

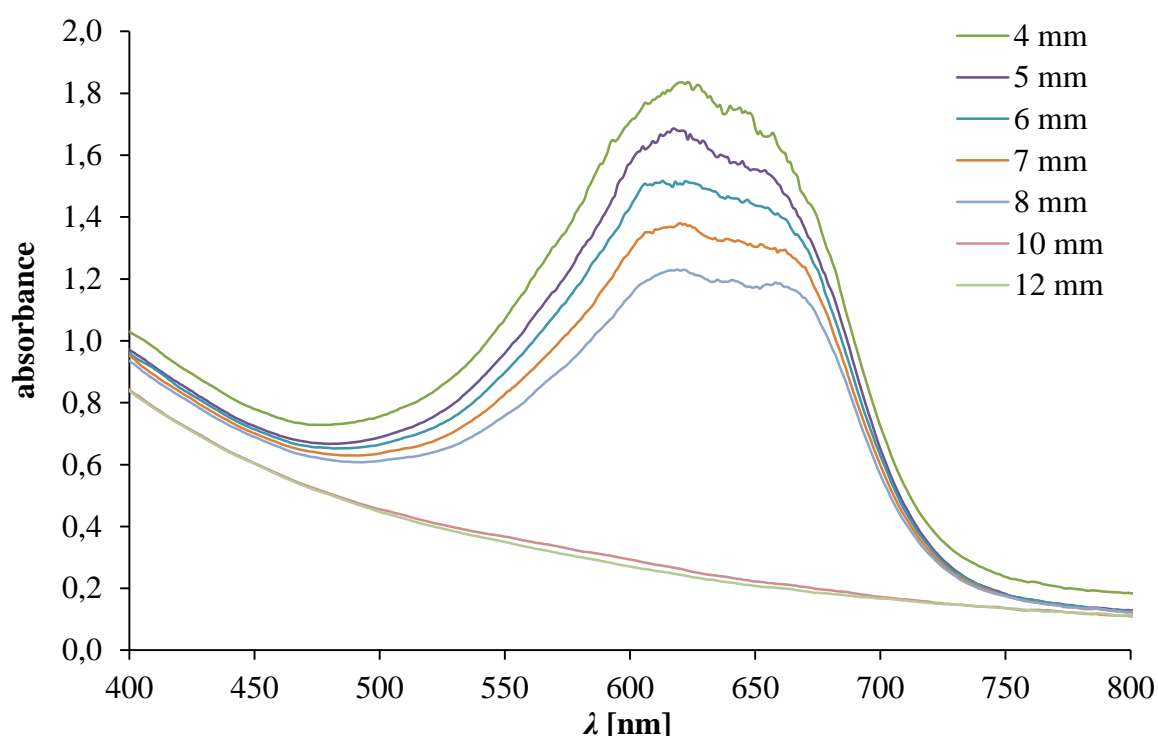


Obr. 21 Spektra odpovídající různým vzdálenostem od rozhraní hydrogel-roztok u barviva Chicago sky blue 6B při $\text{pH} = 3$ v hydrogelu bez chitosanu po 72 hodinách.

Z obrázku výše zároveň vyplývá, že absorbance při λ_{max} pro jednotlivá spektra je prakticky rovnoměrně klesající a nejsou zde patrné žádné skokové změny. Již z tohoto průběhu lze částečně uvažovat, zdali dochází k interakci agarózového hydrogelu s použitým barvivem. Je zřejmé, že koncentrace barviva od rozhraní hydrogel-roztok rovnoměrně klesá, tudíž s největší pravděpodobností nedochází ke hromadění či zakoncentrovávání tohoto barviva blízko rozhraní hydrogel-roztok. Oproti tomu spektra vzniklá monitorováním časové závislosti difúzních

profilů v hydrogelu s přidavkem chitosanu mají zcela odlišný charakter. Obrázek níže (Obr. 22) znázorňuje spektra vzniklá měřením v různých vzdálenostech od rozhraní za použití stejného barviva i podmínek experimentu ($\text{pH} = 3$), avšak v hydrogelu obsahujícím 0,001 hm. % chitosanu.

Jak již bylo několikrát zmíněno, chitosan disponuje přítomností aminoskupiny, která je charakteristická hodnotou disociační konstanty $\text{p}K_A = 6,5$. V roztoku barviva o $\text{pH} = 3$ bude tedy mnohonásobně větší počet protonizovaných aminoskupin, které nesou kladný náboj. Díky tomu bude docházet k elektrostatickým interakcím aminoskupin chitosanu se sulfonovými skupinami použitého barviva. Kromě toho, že bude docházet k ovlivnění procesu difúze, má tato interakce za následek nárůst koncentrace a následné nahromadění barviva u rozhraní hydrogel-roztok. Spektra vzniklá měřením takového vzorku ukazují skokovou změnu koncentrace barviva, která je patrná z grafu níže (Obr. 22).



Obr. 22 *Spektra odpovídající různým vzdálenostem od rozhraní hydrogel-roztok u barviva Chicago sky blue 6B při $\text{pH} = 3$ v hydrogelu s přidavkem chitosanu po 72 hodinách.*

Vzhledem k vysoké koncentraci barviva na rozhraní nebylo možné v případě tohoto barviva k následnému vyhodnocení využít spektrum měřené v poloze 3 mm od rozhraní. Toto spektrum vykazovalo při λ_{max} absorbanci výrazně převyšující použití Lambert-Beerova zákona. Právě koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok byla jedním ze dvou hlavních studovaných parametrů, vedle efektivního difúzního koeficientu. Tento parametr byl určen na základě rovnice odvozené z Fickových zákonů (rovnice 14) s využitím funkce Řešitel v programu MS Excel.

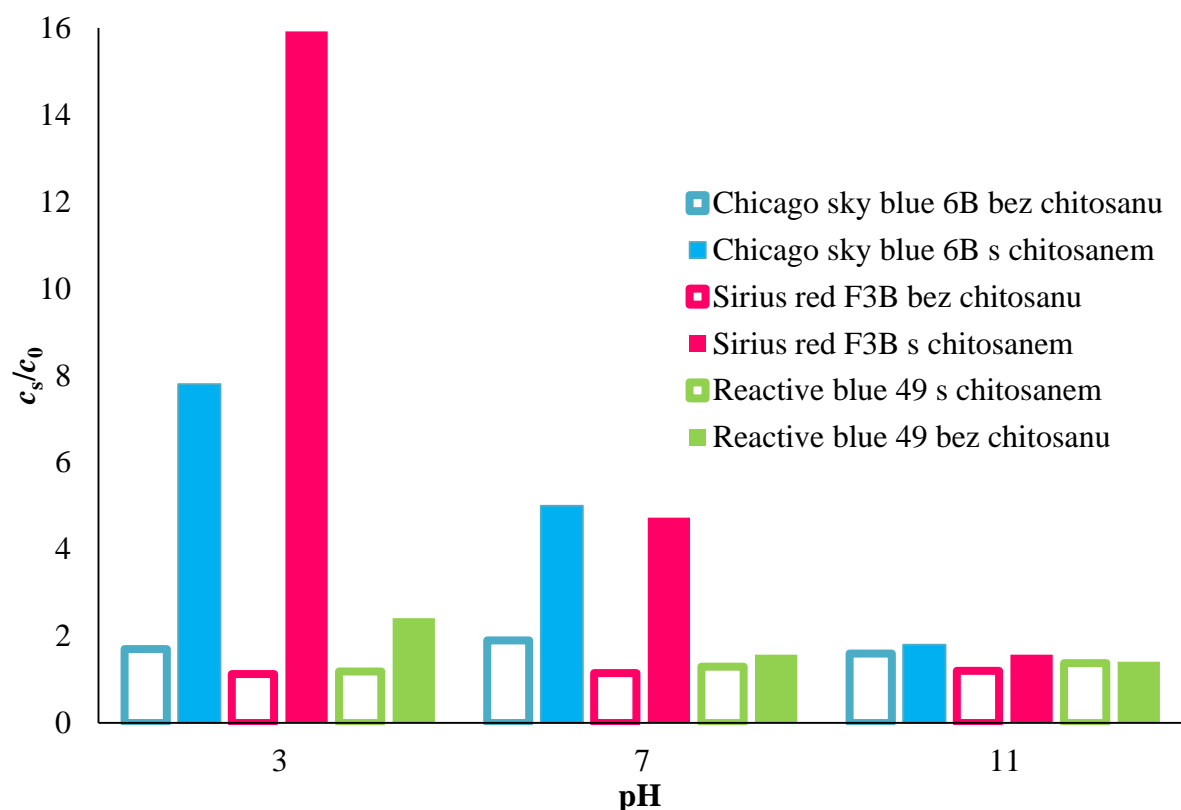
Významnými sorpčními schopnostmi chitosanu se zabývala i řada prací, popsaných v kapitole výše (4.1). Například kolektiv autorů v čele s profesorem Zhengem z univerzity v čínském Kantonu [54] se zabývali studiem sorpční kapacity nově připraveného materiálu na

bázi chitosanu a to pomocí interakce s barvivy za různých pH prostředí. Jak ostatně vyplývá z obrázku výše (Obr. 14), v jimi realizovaném experimentu docházelo k výraznému nárůstu sorpční kapacity vlivem klesajícího pH. U difúzních experimentů realizovaných v rámci předložené diplomové práce docházelo u všech použitých barviv k výraznému nárůstu koncentrace barviva na rozhraní u nižších hodnot pH. Koncentrace barviv na rozhraní pro jednotlivá barviva a hodnoty pH jsou znázorněny v tabulce níže (Tab. 13).

Tab. 13 *Koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok*

barvivo	koncentrace chitosanu v hydrogelu [hm. %]	koncentrace barviva na rozhraní c_s [$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$]		
		pH = 3	pH = 7	pH = 11
Chicago sky blue 6B	0,000	0,017	0,019	0,016
	0,001	0,078	0,050	0,018
Sirius red F3B	0,000	0,045	0,046	0,048
	0,001	0,637	0,189	0,063
Reactive blue 49	0,000	0,119	0,130	0,138
	0,001	0,241	0,157	0,141

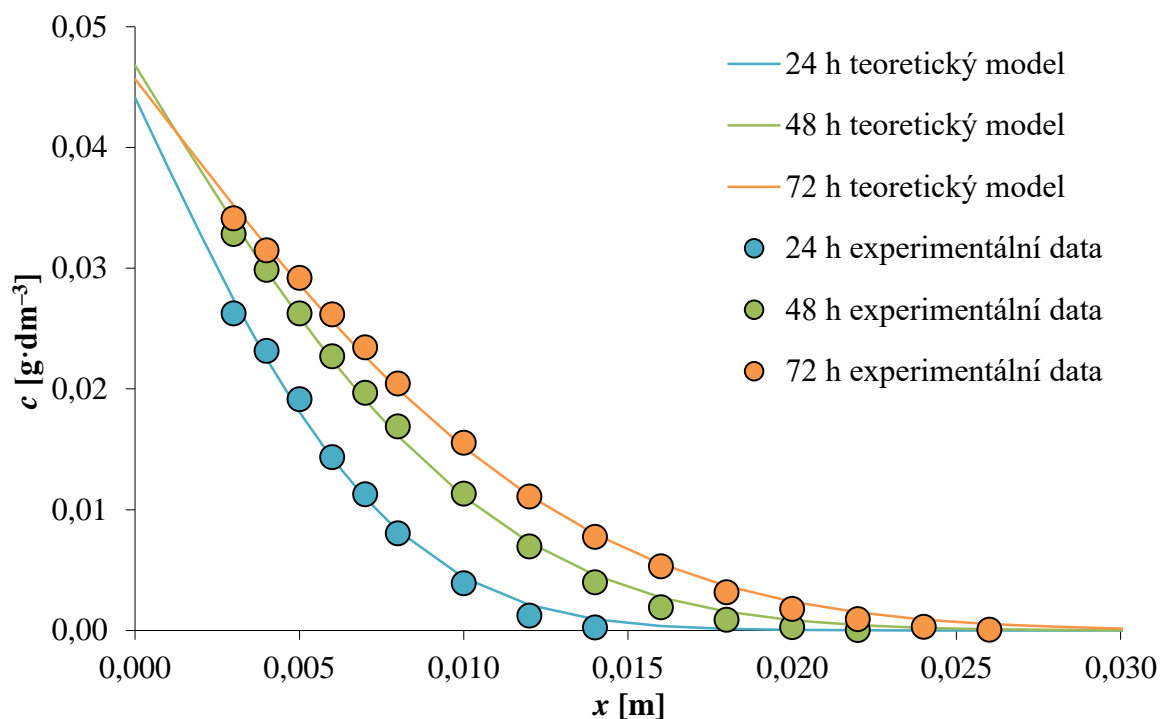
Koncentrace barviv na rozhraní vyjádřené v této tabulce jsou výrazně ovlivněny jejich počátečními koncentracemi. Každé z těchto barviv je charakteristické jiným tvarem absorpčního spektra a i díky tomu vykazuje při stejných koncentracích různou intenzitu zbarvení, resp. absorbanci. Pro lepší porovnání koncentrace na rozhraní c_s mezi jednotlivými barvivy byly tyto hodnoty poděleny koncentrací původního roztoku barviva c_0 . Získané výsledky jsou znázorněny na obrázku níže (Obr. 23). Je zřejmé, že v případě některých barviv je hodnota koncentrace na rozhraní mnohonásobně vyšší, v porovnání s původní koncentrací. Nejvyšší nárůst koncentrace na rozhraní je v případě použití barviva Sirius red F3B o pH = 3 v hydrogelové matici obsahující chitosan.



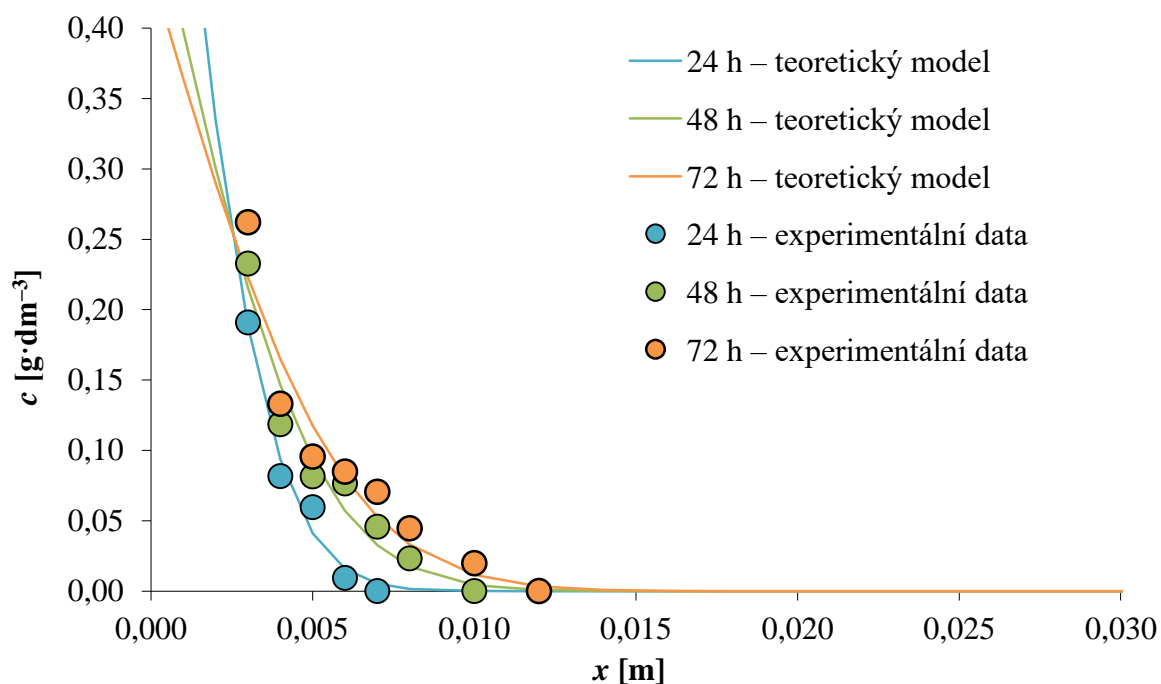
Obr. 23 Koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok podělené počáteční koncentrací barviva.

Hlavní náplní celého experimentu však bylo určit, jaký je vliv pH barviva na jeho difúzi do struktury hydrogelu (s chitosanem i bez chitosanu). Zvoleným parametrem, na základě kterého bylo uvažováno o reaktivitě chitosanu s použitými barvivy, byl efektivní difúzní koeficient D_{eff} . Difúzní koeficient patří mezi základní parametry, s jejichž pomocí lze hodnotit difúzní procesy. Tento parametr v předloženém experimentu prakticky popisuje míru mobility molekul barviva ve struktuře hydrogelu. Obdobně jako v případě koncentrace barviva na rozhraní c_s byl efektivní difúzní koeficient určen na základě proložení experimentálně získaných dat teoretickým modelem funkce odvozené z rovnice výše (rovnice 14). D_{eff} byl následně stanoven metodou nejmenších čtverců pomocí nástroje Řešitel programu MS Excel.

Experimentálně zjištěné koncentrační profily proložené teoretickou funkcí v případě barviva Sirius red F3B o $\text{pH} = 3$ v obou typech hydrogelu jsou znázorněny na obrázku níže (Obr. 24 a Obr. 25). Právě u $\text{pH} = 3$ docházelo vlivem protonizace velkého množství aminoskupin k nejintenzivnějším interakcím biopolymeru chitosanu s molekulami použitých barviv. Jak je patrné z těchto obrázků, tato interakce má za následek výrazné zpomalení difúze barviva do struktury hydrogelu a současně jak již bylo diskutováno výše, dochází k zakoncentrovávání barviva u rozhraní hydrogelu. Nárůst koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok u vzorku obsahující chitosan je patrné z koncentračního profilu níže (Obr. 25).



Obr. 24 Koncentrační profil hydrogelu bez obsahu chitosanu v barvivu Sirius red F3B o $pH = 3$.



Obr. 25 Koncentrační profil hydrogelu s chitosanem (0,001 hm. %) v barvivu Sirius red F3B o $pH = 3$.

Jak vyplývá z výsledků měření efektivního difúzního koeficientu, uvedených v tabulce níže (Tab. 14), s klesajícím pH prostředí dochází k výraznému snižování D_{eff} , což značí pokles mobility molekul barviva uvnitř gelu. Aminoskupina chitosanu má $pK_A = 6,5$. S rostoucí hodnotou pH tak bude docházet k tomu, že stále menší počet aminoskupin bude protonizován

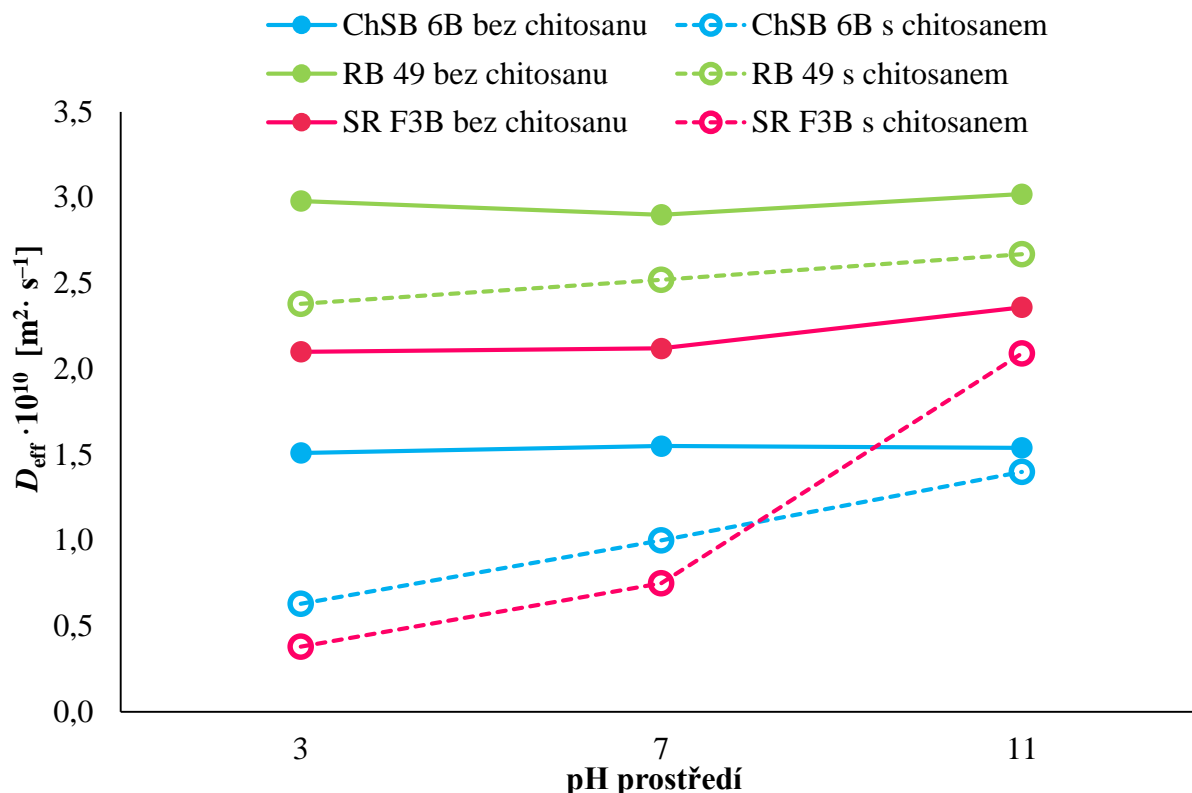
a výrazně se tak sníží elektrostatické interakce mezi aminoskupinou chitosanu a sulfonovou skupinou barviva. Naopak při kyselejším pH bude docházet k elektrostatické interakci výše zmíněných skupin a vzniku komplexů $-\text{NH}_2^+\text{SO}_3^-$ respektive $=\text{NH}^+\text{SO}_3^-$. Právě tyto elektrostatické interakce omezují pronikání barviva hlouběji do struktury hydrogelu a zároveň ovlivňují samotnou mobilitu molekul barviva. Díky tomu pak při nižším pH může docházet ke vzniku zón, které jsou jasně patrné i z absorpčních spekter znázorněných na obrázku výše (Obr. 22).

Tab. 14 *Výsledky měření efektivního difúzního koeficientu studovaných barviv v závislosti na pH.*

Chicago sky blue 6B o $c = 0,010 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$		
Koncentrace chitosanu v hydrogelu:	0,000 hm. %	0,001 hm. %
pH	$D_{\text{eff}} \cdot 10^{10} [\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}]$	
3	$1,51 \pm 0,05$	$0,63 \pm 0,08$
7	$1,55 \pm 0,07$	$1,00 \pm 0,05$
11	$1,54 \pm 0,10$	$1,40 \pm 0,13$
Sirius red F3B o $c = 0,040 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$		
Koncentrace chitosanu v hydrogelu:	0,000 hm. %	0,001 hm. %
pH	$D_{\text{eff}} \cdot 10^{10} [\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}]$	
3	$2,10 \pm 0,04$	$0,38 \pm 0,03$
7	$2,12 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,04$
11	$2,36 \pm 0,05$	$2,09 \pm 0,19$
Reactive blue 49 o $c = 0,100 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$		
Koncentrace chitosanu v hydrogelu:	0,000 hm. %	0,001 hm. %
pH	$D_{\text{eff}} \cdot 10^{10} [\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}]$	
3	$2,98 \pm 0,09$	$2,38 \pm 0,13$
7	$2,90 \pm 0,13$	$2,52 \pm 0,05$
11	$3,02 \pm 0,07$	$2,67 \pm 0,08$

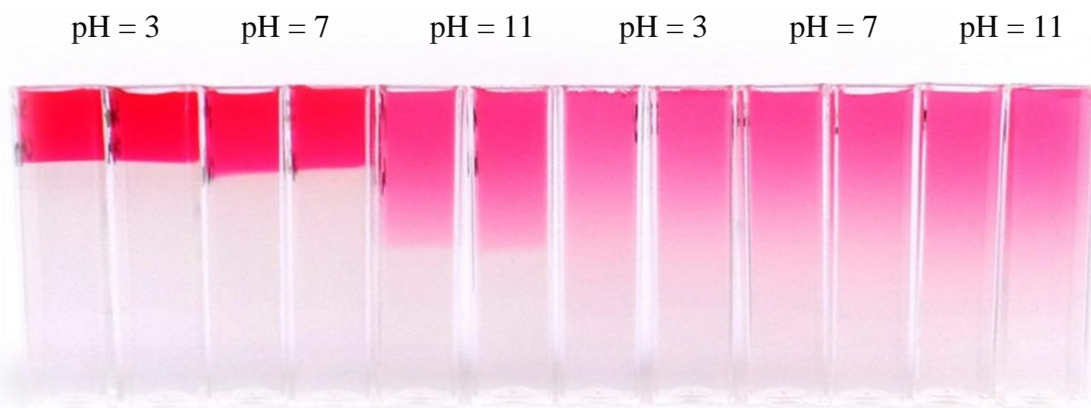
Z obrázku níže (Obr. 26) je zřejmé, že efektivní difúzní koeficient u hydrogelu obsahujícího chitosan (0,001 hm. %) je silně závislý na hodnotě pH, ostatně jak již bylo několikrát

diskutováno. S rostoucí hodnotou pH tedy dochází k nárůstu rychlosti difúze a tím i efektivního difúzního koeficientu. Zatímco u hydrogelu bez přídavku chitosanu nedochází k výraznějším odchylkám v hodnotě efektivního difúzního koeficientu a lze tedy tvrdit, že pH prostředí nemá žádný zásadní vliv na difúzi barviva do struktury hydrogelu.



Obr. 26 Efektivní difúzní koeficient studovaných barviv v závislosti na pH (RB 49 – Reactive blue 49; ChSB 6B – Chicago sky blue; SR F3B – Sirius red F3B).

Jak již bylo zmíněno výše, u hydrogelu obsahující chitosan docházelo u roztoků barviv o pH = 3 a pH = 7 (částečně i pH = 11) vlivem elektrostatických interakcí mezi aminoskupinou chitosanu a sulfonovou skupinou barviv ke vzniku zón, které měly poměrně ostré rozhraní. Díky tomu se pak koncentrace barviva uvnitř hydrogelu měnila skokově. Jak je znázorněno na obrázku níže (Obr. 27) tato skoková změna koncentrace byla patrná i vizuálně. Kyvety jsou vyfocené po 72 hodinách v barvivu Sirius red F3B o různých pH.



Obr. 27 Kyvety s hydrogelem po 72 hod. v roztoku barviva Sirius red F3B o rozdílném pH (zleva 6 kyvet s koncentrací chitosanu 0,001 hm. %, zbývajících 6 kyvet bez přídavku chitosanu).

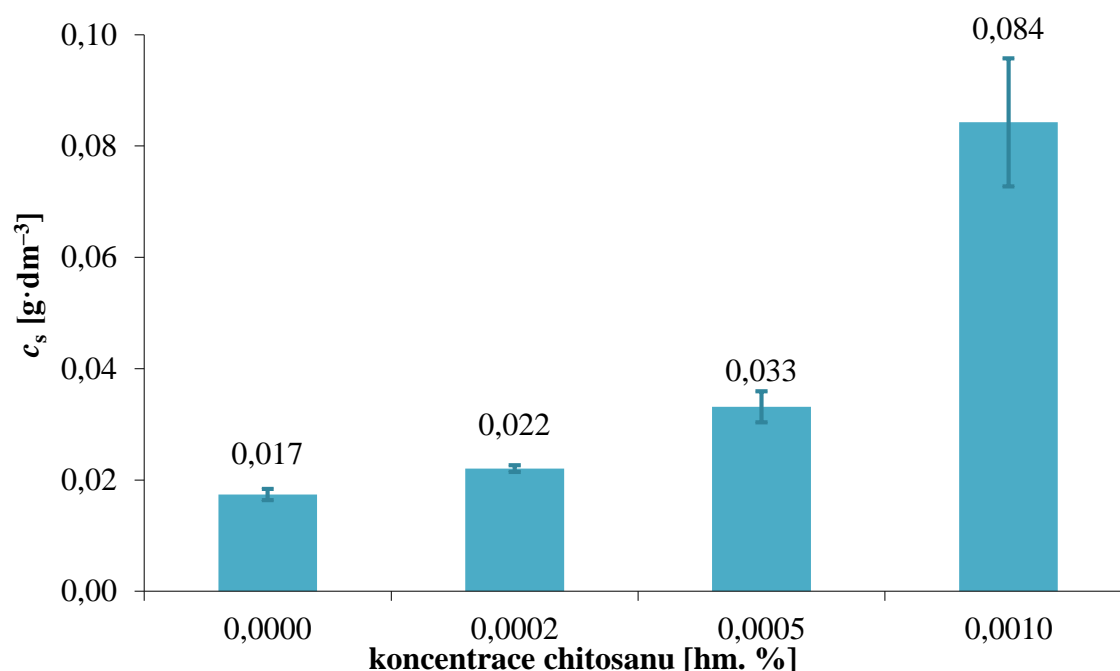
Na základě výsledků měření efektivních difúzních koeficientů, i koncentrací barviv na rozhraní hydrogel-roztok lze diskutovat nad reaktivitou jednotlivých barviv, resp. nad mírou jejich interakce s použitým biopolymerem. Nejvýraznější ovlivnění rychlosti difúze vlivem pH bylo zřejmé u barviva Sirius red F3B a co se týče interakcí s chitosanem lze toto barvivo označit za nejvíce reaktivní, v porovnání s ostatními dvěma barviv. O něco méně reaktivní se jeví barvivo Chicago sky blue 6B, u kterého také došlo k výraznému nárůstu D_{eff} s rostoucím pH. Naopak v případě barviva Reactive blue 49 docházelo k nejmenšímu nárůstu D_{eff} s rostoucím pH. Nejnížší míra interakcí s chitosanem u tohoto barviva je patrná i vizuálně z obrázků v příloze (Příloha 4). Tyto výsledky korespondují také s výsledky provedených sorpčních experimentů, kde největší úbytek koncentrace byl zřejmý taktéž u barviva Sirius red F3B. Nezávisle na sobě se tedy z hlediska reaktivity k interakcím s chitosanem shodují všechny tři parametry, což jenom dokazuje správnost provedených měření a především naměřených výsledků.

Na základě výsledků z provedených difúzních experimentů u použitých barviv byl realizován ještě jeden experiment, jehož cílem bylo stanovit vliv koncentrace chitosanu na difúzi barviva (Chicago sky blue 6B) v roztoku o pH = 3. Podstatou tohoto měření byla taktéž difúzní metoda neustálená difúze v kyvetách. Původní plán pro měření k diplomové práci tento experiment nezahrnoval, avšak na základě zjištěných výsledků (skoková změna koncentrace barviv v hydrogelu u některých hodnot pH) byl tento experiment zrealizován. Studovanými parametry byly, obdobně jako v případě předchozích experimentů, efektivní difúzní koeficient a koncentrace barviva na rozhraní. Výsledky z těchto měření jsou znázorněny v tabulce níže (Tab. 15).

Tab. 15 Výsledky měření efektivního difúzního koeficientu a koncentrace barviva na rozhraní pro hydrogel s různou koncentrací chitosanu pro Chicago sky blue 6B o pH = 3.

w chitosanu v hydrogelu [hm. %]	$D_{\text{eff}} \cdot 10^{10} [\text{m}^2/\text{s}]$	$c_s [\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$
0,0000	$1,85 \pm 0,08$	$0,017 \pm 0,001$
0,0002	$1,82 \pm 0,10$	$0,022 \pm 0,001$
0,0005	$1,57 \pm 0,17$	$0,033 \pm 0,003$
0,0010	$0,67 \pm 0,08$	$0,084 \pm 0,012$

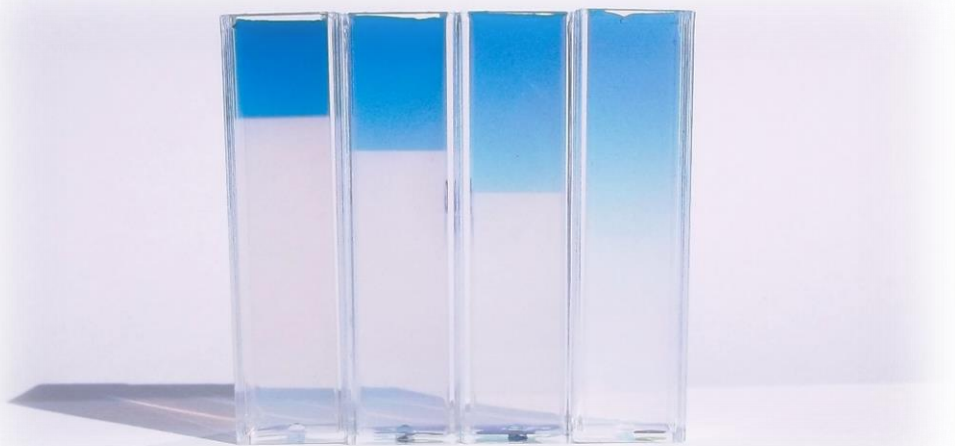
Z výsledků výše je patrné, že koncentrace chitosanu v hydrogelu má velký vliv na rychlost difúzního procesu a výrazně tak ovlivňuje zkoumané parametry, jakými jsou efektivní difúzní koeficient a koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok. Je zřejmé, že s rostoucí koncentrací chitosanu dochází výrazným způsobem ke snižování efektivního difúzního koeficientu. Tento pokles je způsoben nárůstem interakcí použitého barviva s chitosanem, přičemž přítomnost těchto interakcí omezuje pronikání barviva hlouběji do struktury gelu. Zároveň je patrný i vliv množství chitosanu v hydrogelu na koncentraci barviva na rozhraní. Vliv tohoto parametru na koncentraci chitosanu v hydrogelu je znázorněn na obrázku níže (Obr. 28).



Obr. 28 Koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok pro hydrogel s různou koncentrací chitosanu v barvivo Chicago sky blue 6B o pH = 3.

Z obrázku výše jasně vyplývá, že s rostoucí koncentrací chitosanu dochází k výraznému nárůstu koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok. Vzhledem k počáteční koncentraci použitého barviva $c_0 = 0,010 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ je hodnota c_s v případě hydrogelu o nejvyšší studované koncentraci chitosanu, tzn. 0,001 hm. %, více než osminásobná. Tento fakt pouze

potvrzuje často zmiňované sorpční vlastnosti chitosanu. Měření u tohoto vzorku bylo také zatíženo největší chybou (nejvyšší směrodatná odchylka), což ale souvisí s poměrně vysokou naměřenou hodnotou absorbance, při které je patrná nižší opakovatelnost měření. I přesto je zřejmé, že v případě tohoto vzorku docházelo k nejvýraznějšímu zakoncentrovávání barviva blízko rozhraní, jak ostatně znázorňuje obrázek níže (Obr. 29).



Obr. 29 Kyvety s různou koncentrací chitosanu po 72 h v barvivu Chicago sky blue o $pH = 3$.

Poměrně zajímavým jevem, který je patrný z obrázku výše, je ostré koncentrační rozhraní u všech vzorků obsahující chitosan. Tento efekt je zřejmý jednak vizuálně a jednak při samotném měření spekter, kdy v jednotlivých polohách vzorku docházelo v místě rozhraní ke skokové změně koncentrace barviva. Po překonání této vzdálenosti (která, jak je zřejmé z obrázku výše, se pro jednotlivé koncentrace liší) již nebyl patrný výskyt barviva a naměřené spektrum odpovídalo pouze čistému agaróзовému gelu o koncentraci 1 hm. %.

7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zaměřuje na studium interakcí kationaktivního biopolymeru chitosanu s modelovými barvivy při různých hodnotách pH . Tyto interakce byly studovány pomocí metody neustálené difúze v kyvetách, což je jedna z mnoha metod stanovení difúzního koeficientu. Cílem práce bylo zvolit vhodná barviva pro studium vlivu pH pomocí difúzní metody a následná realizace difúzního experimentu.

Míra interakcí kationaktivního biopolymeru s anionaktivními barvivy byla posuzována na základě dvou difúzních parametrů, a to efektivní difúzní koeficient a koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok. Jak popisuje řada referencí, jeví se tyto parametry jako vhodné pro popis interakce biopolymeru se zvolenými difúzními sondami. Na základě zmíněné difúzní metody bylo studováno, jaký vliv má změna pH prostředí na stanovované parametry. Experimentální část spočívala v proměřování kyvet pomocí UV-VIS spektrofotometru, a to v různých polohách od rozhraní hydrogel-roztok za použití vertikálně polohovatelného nástavce.

Nezbytnou součástí předložené diplomové práce je výběr vhodných barviv na základě několika provedených experimentů. Z širokého výběru bylo na základě literární rešerše vybráno 6 zástupců barviv, které by mohly být eventuálně použité pro finální experiment neustálenou difúzi v kyvetách. Jelikož cílem experimentu bylo studium interakcí chitosanu s barvivem při různých hodnotách pH, bylo nezbytné otestovat stabilitu použitých barviv ve všech měřených hodnotách pH ($\text{pH} = 3; 7; 11$). Se změnou pH může u některých barviv docházet k posunům absorpčních pásů v čase, což může negativně ovlivňovat správnost naměřených výsledků. Pomocí této stabilitní studie bylo zjištěno, že jedním z těchto barviv, u kterých dochází ke změně absorpčních pásů v čase, je Direct green 26. Díky tomu již nebylo toto barvivo vybráno pro následné sorpční experimenty. Ty byly realizovány z důvodu zjištění míry interakce chitosanu s modelovými barvivem, resp. jestli vybraná barviva jsou vůbec schopna interakce s chitosanem. Vzhledem k tomu, že chitosan disponuje přítomností aminoskupiny, je schopen interakce s anionaktivními barvivem, která byla použita v tomto experimentu. Tento experiment tedy sloužil k výběru těch barviv, jejichž interakce s chitosanem bude nejvýraznější. Na základě těchto měření byla pro finální difúzní experiment vybrána barviva Chicago sky blue 6B, Sirius red F3B a Reactive blue 49.

Na základě výsledků z difúzních experimentů bylo zjištěno, že s klesající hodnotou pH dochází k výraznému snižování efektivního difúzního koeficientu, což značí pokles mobility molekul barviva uvnitř gelu. Aminoskupina chitosanu má hodnotu disociační konstanty $\text{pK}_A = 6,5$. S rostoucí hodnotou pH tak bude docházet k tomu, že stále menší počet aminoskupin bude protonizován a výrazně se tak sníží elektrostatické interakce mezi aminoskupinou chitosanu a sulfonovou skupinou barviva. Naopak při vyšším pH bude docházet k elektrostatické interakci výše zmíněných skupin. Právě tyto elektrostatické interakce omezují pronikání barviva hlouběji do struktury hydrogelu a zároveň ovlivňují samotnou mobilitu molekul barviva. Kromě toho má tato interakce za následek i nárůst koncentrace a následné nahromadění barviva u rozhraní hydrogel-roztok. To ostatně vyplývá z druhého studovaného parametru, kterým je koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok.

Na základě výsledků z provedených difúzních experimentů u použitých barviv byl realizován ještě jeden experiment, jehož cílem bylo stanovit vliv koncentrace chitosanu na difúzi barviva (Chicago sky blue 6B) v roztoku o $\text{pH} = 3$. Podstatou tohoto měření byla také difúzní metoda neustálená difúze v kyvetách. Při těchto měřeních bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací chitosanu uvnitř gelu dochází k výraznému poklesu efektivního difúzního koeficientu a současně dochází k vysokému nárůstu koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok. Zároveň bylo zjištěno, že i při nízké koncentraci chitosanu dochází v hydrogelu ke tvorbě poměrně ostrého koncentračního rozhraní, které je také způsobené důsledkem elektrostatických interakcí chitosanu s barvivem.

Obecně lze říci, že studium interakcí nejen biopolymerů, ale i řady dalších látek s barvivem za použití hydrogelových matic přináší řadu výhod. Těmi může být především příprava matic o definované velikosti a tloušťce, vhodně zvolená velikost pórů matrice atd. Při použití těchto gelových systémů v kombinaci s difúzními experimenty, lze získat velice účinný, avšak jednoduchý nástroj pro stanovení difúzních koeficientů látek, s odchylkou do 5 rel. % od skutečné hodnoty. Neustálená difúze v kyvetách se jeví jako vhodný nástroj pro studium reaktivity řady dalších biopolymerů.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] JENSEN, William B. The Origin of the Polymer Concept. *Journal of Chemical Education* [online]. 2008, vol. 85, issue 5, 624-625. DOI: 10.1021/ed085p624. ISSN 0021-9584.
- [2] MOHANTY, Amar K, Manjusri MISRA a Lawrence T DRZAL. *Natural fibers, biopolymers, and biocomposites*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, 2005. ISBN 084931741X.
- [3] KHOR, Eugene. Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* [online]. 2002, vol. 6, issue 4, s. 313-317. DOI: 10.1016/S1359-0286(02)00002-5.
- [4] SARMENTO, Bruno Filipe Carmelino Cardoso a José das NEVES. *Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: delivery, targeting, and polymer therapeutics*. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, 2012.
- [5] VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan and Its Pharmaceutical Applications. In: *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2009. ISSN 0009-2770.
- [6] KURITA, Keisuke. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Marine Biotechnology* [online]. 2006, vol. 8, issue 3, 203-226. DOI: 10.1007/s10126-005-0097-5. ISSN 1436-2228.
- [7] OKUYAMA, Kenji, Keiichi NOGUCHI, Takashi MIYAZAWA, Toshifumi YUI a Kozo OGAWA. Molecular and Crystal Structure of Hydrated Chitosan. *Macromolecules* [online]. 1997, vol. 30, issue 19, s. 5849-5855. DOI: 10.1021/ma970509n.
- [8] YUI, Toshifumi, Kiyohisa IMADA, Kenji OKUYAMA, Yutaka OBATA, Katsumi SUZUKI a Kozo OGAWA. Molecular and crystal structure of the anhydrous form of chitosan. *Macromolecules* [online]. 1994, vol. 27, issue 26, s. 7601-7605. DOI: 10.1021/ma00104a014.
- [9] KHOR, Eugene a Lee Yong LIM. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* [online]. 2003, vol. 24, issue 13, s. 2339-2349. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00026-7.
- [10] Cárdenas, Galo, Gustavo Cabrera, Edelio Taboada a Marguerite Rinaudo. Synthesis and characterization of chitosan alkyl phosphate. *Journal of the Chilean Chemical Society* [online]. 2006, vol. 51, issue 1, s. -. DOI: 10.4067/S0717-97072006000100011.
- [11] RAVI KUMAR, Majeti N. V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2000, vol. 46, issue 1, s. 1-27. DOI: 10.1016/S1381-5148(00)00038-9.
- [12] DEMARGER-ANDRE, S. a A. DOMARD. Chitosan carboxylic acid salts in solution and in the solid state: a biomaterial in waiting. *Carbohydrate Polymers* [online]. 1994, vol. 23, issue 3, s. 211-219. DOI: 10.1016/0144-8617(94)90104-X.

- [13] BLAGODATSKIKH, Inesa V., Evgeniya A. BEZRODNYKH, Sergey S. ABRAMCHUK, Alexander V. MURANOV, Olga V. SINITSYNA, Alexei R. KHOKHLOV a Vladimir E. TIKHONOV. Short chain chitosan solutions: self-assembly and aggregates disruption effects. *Journal of Polymer Research* [online]. 2013, vol. 20, issue 2, s. -. DOI: 10.1007/s10965-013-0073-0.
- [14] ROUSSY, Jean, Maurice VAN VOOREN, Brian A. DEMPSEY a Eric GUIBAL. Influence of chitosan characteristics on the coagulation and the flocculation of bentonite suspensions. *Water Research* [online]. 2005, vol. 39, issue 14, s. 3247-3258. DOI: 10.1016/j.watres.2005.05.039. ISSN 00431354.
- [15] GUIBAL, Eric. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Separation and Purification Technology* [online]. 2004, vol. 38, issue 1, s. 43-74 DOI: 10.1016/j.seppur.2003.10.004. ISSN 13835866.
- [16] EL-HEFIAN, E. A., M. M. NASEF a A. H. YAHAYA. Chitosan Physical Forms: A short review. In: *Australian journal of basic and applied sciences / International network for scientific information ; INSInet* [online]. 2011. ISSN 1991-8178.
- [17] KUMAR, M. N. V. Ravi, R. A. A. MUZZARELLI, C. MUZZARELLI, H. SASHIWA a A. J. DOMB. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews* [online]. 2004, vol. 104, issue 12, s. 6017-6084. DOI: 10.1021/cr030441b. ISSN 0009-2665.
- [18] NWE, Nitar, FURUIKE, Tetsuya, TAMURA, Hiroshi. The mechanical and biological properties of chitosan scaffolds for tissue regeneration templates are significantly enhanced by chitosan from *Gongronella butleri*. *Materials*, 2009, vol. 2, issue 2, s. 374-398. DOI: 10.3390/ma2020374.
- [19] TRUNG, Trang Si, Wah Wah THEIN-HAN, Nguyen Thi QUI, Chuen-How NG a Willem F. STEVENS. Functional characteristics of shrimp chitosan and its membranes as affected by the degree of deacetylation. *Bioresource Technology* [online]. 2006, vol. 97, issue 4, 659-663. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.03.023. ISSN 09608524
- [20] HOMAYONI, Homa, Seyed Abdolkarim Hosseini RAVANDI a Masoumeh VALIZADEH. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2009, vol. 77, issue 3, 656-661. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.02.008. ISSN 01448617.
- [21] NAGPAL, Kalpana, Shailendra Kumar SINGH a Dina Nath MISHRA. Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. *Chemical & Pharmaceuticals bulletin* [online]. 2010, vol. 58, issue 11, 1423-1430. DOI: 10.1248/cpb.58.1423. ISSN 0009-2363.
- [22] GIUNCHEDI, Paolo, Claudia JULIANO, Elisabetta GAVINI, Massimo COSSU a Milena SORRENTI. Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2002, vol. 53, issue 2, 233-239. DOI: 10.1016/S0939-6411(01)00237-5. ISSN 09396411.

- [23] DUTTA, Pradip Kumar; DUTTA, Joydeep; TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of scientific and industrial research* [online], 2004, vol. 63, issue 1, s. 20-31. ISSN 0975-1084.
- [24] EL HADRAMI, Abdelbasset, et al. Chitosan in plant protection. *Marine drugs* [online], 2010, vol 8, issue 4. s. 968-987. DOI: 10.3390/md8040968
- [25] DUTTA, Pradip Kumar, M. N. V. RAVIKUMAR a Joydeep DUTTA. Chitin and chitosan for versatile applications. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* [online]. 2002, vol. 42, issue 3, 307-354. DOI: 10.1081/MC-120006451. ISSN 1532-1797.
- [26] RHEE, Jae-Seong, Min-Woo JUNG a Ki-Jung PAENG. Evaluation of Chitin and Chitosan as a Sorbent for the Preconcentration of Phenol and Chlorophenols in Water. *Analytical Sciences* [online]. 1998, vol. 14, issue 6, 1089-1092. DOI: 10.2116/analsci.14.1089. ISSN 0910-6340.
- [27] RAVI KUMAR, Majeti N. V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2000, vol. 46, issue 1, s. 1-27. DOI: 10.1016/S1381-5148(00)00038-9.
- [28] KIM, Ho-Joong, Kangyi ZHANG, Laura MOORE a Dean HO. Diamond Nanogel-Embedded Contact Lenses Mediate Lysozyme-Dependent Therapeutic Release. *ACS Nano*. 2014, vol. 8, issue 3, s. 2998-3005. DOI: 10.1021/nn5002968.
- [29] BAYSAL, Kemal, Ayse Z. AROGUZ, Zelal ADIGUZEL a Bahattin M. BAYSAL. Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: Preparation, characterization and application for cell growth purposes. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2013, vol. 59, issue 8, s. 342-348. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.073. ISSN 01418130.
- [30] TAN, Huaping, Constance R. CHU, Karin A. PAYNE a Kacey G. MARRA. Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2009, vol. 30, issue 13, s. 2499-2506. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.080. ISSN 01429612
- [31] MIGUEL, Sónia P., Maximiano P. RIBEIRO, Hugo BRANCAL, Paula COUTINHO a Ilídio J. CORREIA. Thermoresponsive chitosan–agarose hydrogel for skin regeneration. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, vol. 111, issue 4, s. 366-373. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.04.093. ISSN 01448617
- [32] DODANE, Valérie a Vinod D VILIVALAM. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharmaceutical Science* [online]. 1998, vol. 1, issue 6, s. 246-253. DOI: 10.1016/S1461-5347(98)00059-5.
- [33] SINGH, Ram Lakhan, Pradeep Kumar SINGH a Rajat Pratap SINGH. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes – A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2015, vol. 104, issue 1, s. 21-31. DOI: 10.1016/j.ibiod.2015.04.027. ISSN 09648305.
- [34] ABBOTT, Laurence C., et al. Spectroscopic studies of the intermolecular interactions of a bis-azo dye, direct blue 1, on di- and trimerization in aqueous solution and in

- cellulose. *The Journal of Physical Chemistry B* [online], 2004, vol. 108, issue 36, s. 13726-13735. DOI: 10.1021/jp0485542.
- [35] HE, Zongsheng, Lingdi YAN, Zheng YONG, Zhaoqi DONG, Huajin DONG a Zehui GONG. Chicago sky blue 6B, a vesicular glutamate transporters inhibitor, attenuates methamphetamine-induced hyperactivity and behavioral sensitization in mice. *Behavioural Brain Research* [online]. 2013, vol. 239, issue 4, s. 172-176. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.11.003. ISSN 01664328.
- [36] DAPSON, RW, C FAGAN, JA KIERNAN a TW WICKERSHAM. Certification procedures for sirius red F3B (CI 35780, Direct red 80). *Biotechnic & Histochemistry* [online]. 2011, vol. 86, issue 3, s. 133-139. DOI: 10.3109/10520295.2011.570277. ISSN 1052-0295.
- [37] WANG, Baoe a Xiu GUO. Reuse of waste beer yeast sludge for biosorptive decolorization of reactive blue 49 from aqueous solution. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2011, vol. 27, issue 6, s. 1297-1302. DOI: 10.1007/s11274-010-0576-3. ISSN 0959-3993.
- [38] RENN, Donald W. Agar and agarose: indispensable partners in biotechnology. *Industrial* [online]. 1984, vol. 23, issue 1, s. 17-21. DOI: 10.1021/i300013a004.
- [39] *Life Technologies Corporation* [online]. 2013. Dostupné z: <<http://www.lifetechnologies.com/>>.
- [40] Agarose Selection Guide. *Sigma-Aldrich chemical directory* [online]. Nottingham: Hampden Data, c1997.
- [41] FUJII, T. Scaling analysis on elasticity of agarose gel near the sol–gel transition temperature. *Food Hydrocolloids* [online]. 2000, vol. 14, issue 4, s. 359-363. DOI: 10.1016/S0268-005X(00)00012-6.
- [42] STOKOLS, Shula, Jeff SAKAMOTO, Chris BRECKON, Todd HOLT, James WEISS a Mark H. TUSZYNSKI. Templated Agarose Scaffolds Support Linear Axonal Regeneration. *Tissue Engineering* [online]. 2006, vol. 12, issue 10, s. 2777-2787. DOI: 10.1089/ten.2006.12.2777.
- [43] SEDLÁČEK, Petr, Jiří SMILEK a Martina KLUČÁKOVÁ. How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – Results from diffusion cells. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2013, vol. 73, issue 11, s. 1500-1509. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2013.07.008.
- [44] <http://vydavatelstvi.vscht.cz>. *Vydavatelství VŠCHT* [online].
- [45] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 244 s. ISBN 80-708-0579-X.
- [46] DOJČANSKÝ, Ján a Jaroslav LONGAUER. *Chemické inžinierstvo II: difúzne procesy, prestup látky, absorpcia, adsorpcia, destilácia a rektifikácia, extrakcia, úprava vzduchu a chladenie vody, sušenie, kryštalizácia, membránové procesy*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2000, 392 s. ISBN 80- 967-0648-9.

- [47] ATKINS, Peter a Julio de PAULA. *Atkins` physical chemistry*. 8th ed. Oxford: Oxford University Press, 2006, 1064 s. ISBN 01-987-0072-5.
- [48] SEDLÁČEK, Petr. *Hydrogely huminových kyselin - experimentální i aplikační forma*. Brno, 2009. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [49] CUSSLER, E. *Diffusion: mass transfer in fluid systems*. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2009, XVII, 631 p. ISBN 05-218-7121-2.
- [50] CRANK, J.: *The Mathematics of Difussion*, 2nd ed. Oxford: Claredon Press 1975.
- [51] GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. et al.: Overview of laboratory methods employed for obtaining diffusion coefficients in FEBEX compacted bentonite. In *Journal of Iberian Geology* 32 (1) 2006: 37-53. ISSN: 1698-6180.
- [52] HLAVÁČ, J. *Základy technologie silikátů*. Druhé upravené vydání. Praha 1988. SNTL – Nakladatelství technické literatury, n. p.
- [53] LAKATOS, I. a J. LAKATOS-SZABÓ. Diffusion of chromium ions in polymer/silicate gels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 1998, vol. 141, issue 3, s. 425-434. DOI: 10.1016/S0927-7757(97)00141-6.
- [54] LIUCHUN ZHENG, CHENGGANG WANG, YUEHONG SHU, XIAOMIN YAN a LAISHENG LI. Utilization of diatomite/chitosan-Fe (III) composite for the removal of anionic azo dyes from wastewater: Equilibrium, kinetics and thermodynamics. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2015, vol. 468, s. 129-139. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2014.12.015
- [55] PENG, Qi, Mingxian LIU, Jianwen ZHENG a Changren ZHOU. Adsorption of dyes in aqueous solutions by chitosan–halloysite nanotubes composite hydrogel beads. *Microporous and Mesoporous Materials* [online]. 2015, vol. 201, s. 190-201. DOI: 10.1016/j.micromeso.2014.09.003. ISSN 13871811.
- [56] TIERA, Marcio J., Xing-Ping QIU, Sofiane BECHAOUCH, Qin SHI, Júlio C. FERNANDES a Françoise M. WINNIK. Synthesis and Characterization of Phosphorylcholine-Substituted Chitosans Soluble in Physiological pH Conditions. *Biomacromolecules* [online]. 2006, vol. 7, issue 11, s. 3151-3156. DOI: 10.1021/bm060381u. ISSN 1525-7797.
- [57] TRAN, Van Son, Huu Hao NGO, Wenshan GUO, Jian ZHANG, Shuang LIANG, Cuong TON-THAT a Xinbo ZHANG. Typical low cost biosorbents for adsorptive removal of specific organic pollutants from water. *Bioresource Technology* [online]. 2015, vol. 182, s. 353-363. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.02.003. ISSN 09608524.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

9.1 Použité zkratky

zkratka	význam zkratky
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra
RNA	ribonukleová kyselina
ICCC	mezinárodní konference o chitinu a chitosanu
DMSO	dimethylsulfoxid
DMF	dimethylformamid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
3D	trojrozměrný
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
FADH ₂	flavinadenindinukleotid
VGLUT _s	vezikulární glutamátové transportéry
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
NMR	nukleární magnetická rezonance
HNT _s	minerál halloyzit
PC	fosforylcholin
RPM	počet otáček za minutu

9.2 Použité symboly

<i>symbol</i>	<i>význam</i>	<i>jednotka</i>
t	čas	[s]
D_s	distribuční koeficient	
c_{eq}	rovnovážná koncentrace	[g·dm ⁻³]
W	práce vykonána systémem	[J]
μ	chemický potenciál	[J·mol ⁻¹]
x	vzdálenost	[m]
p	tlak	[Pa]
T	teplota	[K]
F	síla	[N]
J_i	difúzní tok	[mol·s ⁻¹]
j_i	tok přes jednotkovou plochu	[mol·m ⁻² ·s ⁻¹]
A	plocha	[m ²]
D	difúzní koeficient	[m ² ·s ⁻¹]
D_{eff}	efektivní difúzní koeficient	[m ² ·s ⁻¹]
c	molární koncentrace	[mol·m ⁻³]
l	tloušťka filmu	[m]
ε	rozdělovací koeficient	
c_{I0}, c_{II}	koncentrace roztoků oddělených přepážkou	[mol·m ⁻³]
erf	chybová funkce	
$erfc$	komplementární chybová funkce	
r_l	rychlost chemické reakce	[mol·m ⁻³ ·s ⁻¹]
k	rychlostní konstanta	[s ⁻¹]
K	rovnovážná konstanta	
n	látkové množství	[mol]
β	konstanta aparatury	[m ⁻²]
V	objem	[m ³]
$c_{I\infty}$	původní koncentrace v difúzní cele	[mol·m ⁻³]
Q_e, q	sorpční kapacita	[g·kg ⁻¹]
Q_{max}	maximální sorpční kapacita	[g·kg ⁻¹]
λ	vlnová délka	[nm]

λ_{\max}	vlnová délka, při které je hodnota absorbance nejvyšší	[nm]
R^2	koeficient spolehlivosti	
A	absorbance	
w	hmotnostní koncentrace	[hm. %]
c_s	koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok	[g·dm ⁻³]
c_0	počáteční koncentrace roztoku barviva	[g·dm ⁻³]

10 SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace tématicky pokrývající klíčovou část předložených experimentů. Převážně se jedná o konferenční příspěvky.

KOLESA, P.; SMILEK, J.; SEDLÁČEK, P.; KLUČÁKOVÁ, M. Studium reaktivity kationaktivního biopolymeru jednoduchými laboratorními technikami – neustálená difúze v kyvetách. In *Studentská konference Chemie je život Sborník příspěvků*. Brno: FCH VUT, 2013. s. 89-93. ISBN: 978-80-214-4823- 0.

SMILEK, J.; KOLESA, P.; SEDLÁČEK, P.; KLUČÁKOVÁ, M. The Reactivity of Cationic Biopolymer Studied by Interactions with Organic Dyes. *Frontiers in material and life sciences*. Brno: CEITEC, 2014. s. 216-216. ISBN: 978-80-210-7159- 9.

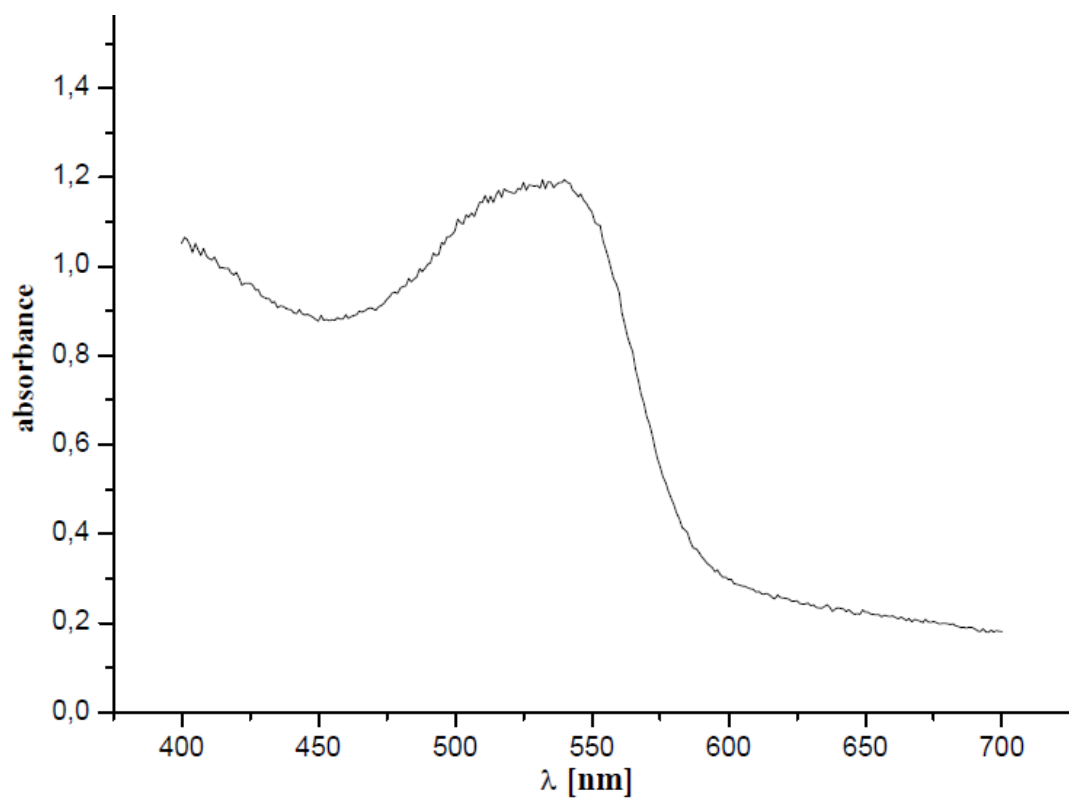
KOLESA, P.; SMILEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. Vliv polyelektrolytových biopolymerů na transport iontů. In *Chemie je život, Studentská konference*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 61200 Brno, 2014. s. 95-100. ISBN: 978-80-214-5078- 3.

SMILEK, J.; KOLESA, P.; SEDLÁČEK, P.; KLUČÁKOVÁ, M. Studium reaktivity kationaktivního biopolymeru interakcí s anionaktivními barvivy. In *Studentská vědecká konference 2014*. Ostrava, Česká republika: 2014. s. 1-4. ISBN: 978-80-7464-359- 0.

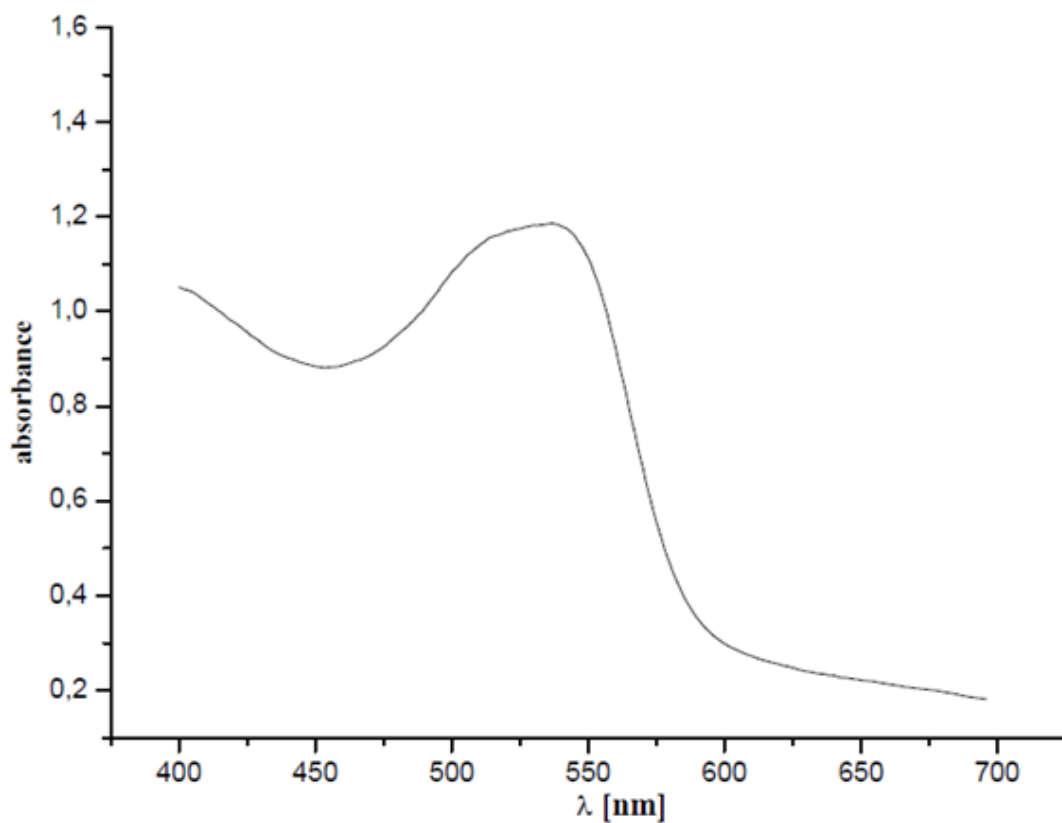
KOLESA, P.; KLUČÁKOVÁ, M.; SMILEK, J. Studium interakcí barviv s biopolymerem chitosanem. In *Chemie je život, Studentská konference*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 61200 Brno, 2015. s. 93-98. ISBN: 978-80-214-5290- 9.

11 SEZNAM PŘÍLOH

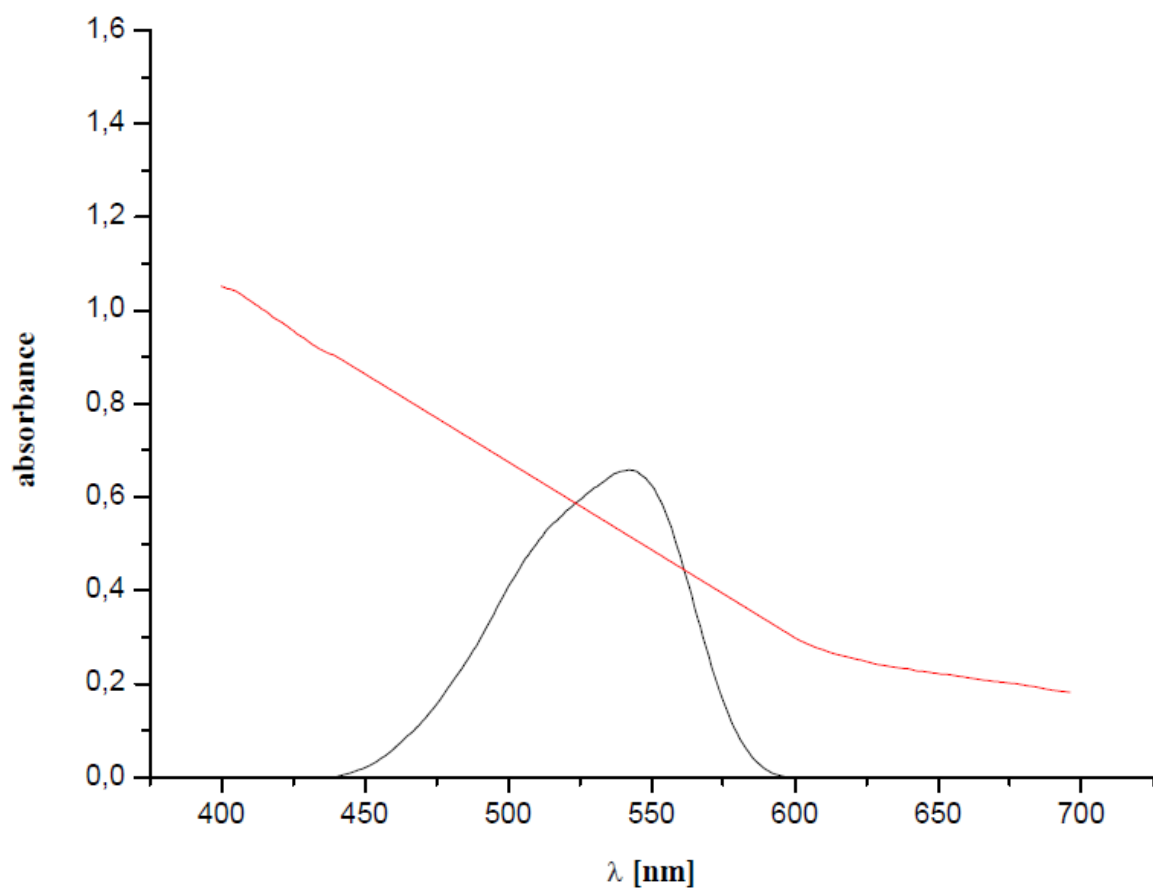
- | | |
|-----------|---|
| PŘÍLOHA 1 | Naměřené absorpční spektrum hydrogelu v barvivu Sirius red F3B. |
| PŘÍLOHA 2 | Naměřené absorpční spektrum hydrogelu v barvivu Sirius red F3B upravené v programu Origin 8. |
| PŘÍLOHA 3 | Kyvety s hydrogelem obsahujícím chitosan o koncentraci 0,001 hm. % po 72 h v roztoku barviva Reactive blue 49 o různém pH. Zleva po dvojicích kyvety v pH = 3; 7; 11. |
| PŘÍLOHA 4 | Vyhlazené absorpční spektrum s korekcí vlivu hydrogelu (červená křivka představuje vyhlazené spektrum, černá reprezentuje změnu absorbance pouze vlivem barviva). |



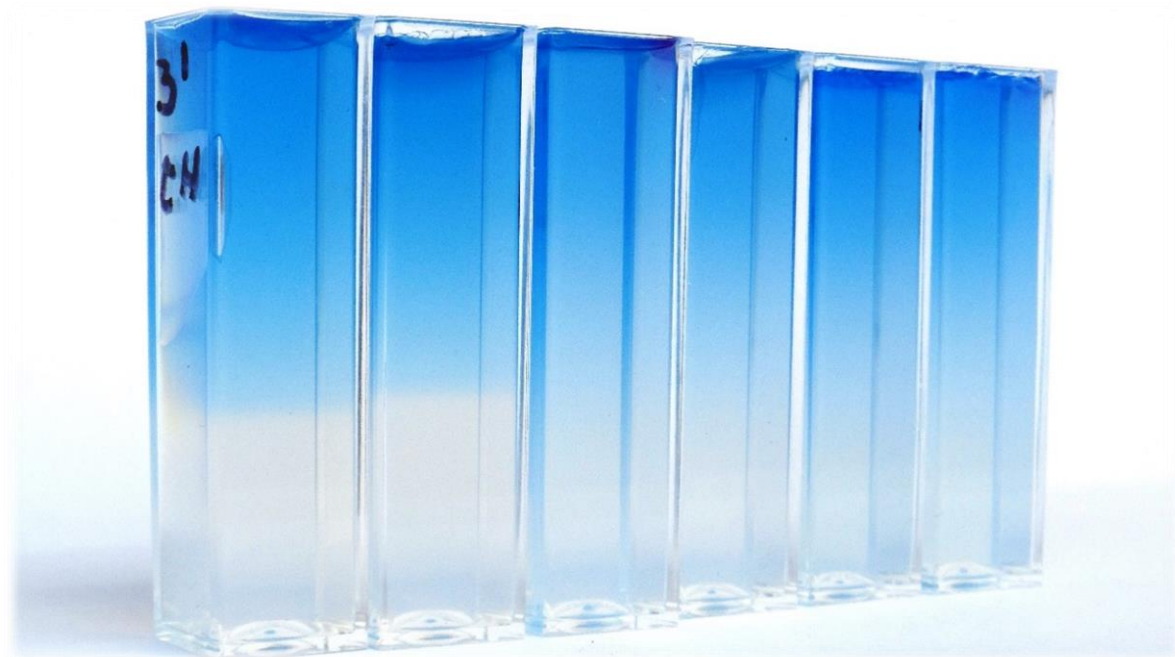
Příloha 1 Naměřené absorpční spektrum hydrogelu v barvivu Sirius red F3B.



Příloha 2 Naměřené absorpční spektrum hydrogelu v barvivu Sirius red F3B upravené v programu Origin 8.



Příloha 3 Vyhlazené absorpční spektrum s korekcí vlivu rozpouštědla (červená křivka představuje vyhlazené spektrum, černá reprezentuje změnu absorbance pouze vlivem barviva).



Příloha 4 Kyvetky s hydrogelem obsahujícím chitosan o koncentraci 0,001 hm. % po 72 h v roztoku barviva Reactive blue 49 o různém pH. Zleva po dvojicích kyvetky v pH = 3; 7; 11.